

Aus dem Institut für Virologie  
des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität

Direktor: Prof. Dr.med H.-D.Klenk

# **Virusinduzierte Fusion zur Beseitigung von Tumorzellen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von

**Germán Horn**

aus Concepción del Uruguay

Provinz Entre Ríos

Argentinien

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am

3. März 2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med B. Maisch

Referent: PD Dr. med Matthias Dobbelsstein

1° Korreferent: Prof. Dr. R. Müller

2° Korreferent: Prof. Dr. Wels (Frankfurt/M.)

*Für alle meine Dozenten der Kunst des Heilens*

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen hat Herr Germán Horn in der Zeit von August 2001 bis Juli 2003 am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. Matthias Döbelstein in dessen Arbeitsgruppe durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1       ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2       EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
2.1   Die Biologie der Adenoviren .....	2
2.1.1   Überblick.....	2
2.1.2   Die Struktur der Viruspartikel.....	3
2.1.3   Funktion früher und später adenoviraler Genprodukte .....	4
Frühe adenovirale Proteine.....	4
Späte adenovirale Proteine .....	6
2.1.4   Die Morphogenese der Viruspartikel .....	6
2.2   Adenoviren in der onkolytischen Tumorthherapie.....	7
2.2.1   Stand der Forschung.....	7
2.2.2   Erzeugung rekombinanter Adenoviren .....	8
2.2.3   Die Verbesserung der Effizienz, ein Hauptziel.....	9
2.3   Die Zellfusion als Strategie für eine bessere Tumorerstörung .....	9
2.3.1   Bisherige Charakterisierung fusionsfähiger Adenoviren .....	10
2.4   Das Masernvirus und seine Fusionsproteine .....	13
2.5   Fragestellung .....	14
<b>3       MATERIAL .....</b>	<b>15</b>
3.1   Chemikalien .....	15
3.2   Fusionsinhibierendes Peptid (FIP) .....	16
3.3   Enzyme.....	16
3.4   Kits.....	17
3.5   Verbrauchsmaterialien .....	17
3.6   Antikörper .....	18
3.7   Oligonukleotide.....	19
3.8   Zellkulturmedien & Zusätze.....	19
3.9   Bakterien, Viren und humane Zellen .....	20
Bakterien.....	20
Viren.....	20
Virale Vektoren.....	20
Humane Zellen .....	20
3.10   Plasmide und Vektoren .....	21
3.11   Puffer.....	21

3.12	Geräte .....	23
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>24</b>
4.1	Zellbiologische und virologische Methoden .....	24
4.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	24
4.1.2	Präparation einer Virussuspension .....	24
4.1.3	Titration einer Virussuspension .....	24
4.1.4	Immunfluoreszenz .....	25
4.1.5	Infektion von Zellen mit Adenoviren .....	25
4.1.6	Transduktion von Zellen mit Adenoviren .....	26
4.1.7	Transiente Transfektion mit Lipfectamin Plus .....	27
4.1.8	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) .....	27
4.1.9	Kultivierung und Selektion von Bakterien .....	32
4.1.10	Inhibierung der Masernvirusprotein-F <sub>1</sub> induzierten Fusion durch FIP (Fusionsinhibierendes Peptid) .....	32
4.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	34
4.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
4.2.2	Ethanol-fällung .....	34
4.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	35
4.2.4	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen .....	35
4.2.5	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	36
4.2.6	Sequenzierung von DNA .....	36
4.2.7	DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen .....	37
4.2.8	Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) .....	37
4.2.10	Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräparation) .....	40
4.2.11	Plasmid-Präparation in großem Maßstab (Maxi-Präparation) .....	40
4.2.12	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	41
4.2.13	Auffüllung nicht kompatibler, überhängender Enden .....	42
4.2.14	Dephosphorylierung von Vektor-DNA .....	42
4.2.15	Ligation .....	42
4.2.16	Chemische Transformation .....	43
4.2.17	Elektroporation .....	43
4.2.18	Isolierung von RNA mit Trizol .....	44
4.2.19	DNase Behandlung .....	44
4.2.20	Reverse Transkription .....	45
4.2.21	Semi-quantitative RT-PCR .....	46
4.2.22	Luziferase-Test .....	47
4.2.23	Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem AdEasy-System .....	47
4.2.23.1	Generation von Rekombinanten Klonen in Bakterienzellen .....	49

4.2.23.1.1	Erzeugung der Ad CMV F&H- und Ad MLP F&H-Vektoren zur Expression von Masernvirus F- und H-Proteinen.....	49
4.2.23.1.2	Erzeugung des Ad MLP Luc <sup>+</sup> -Vektors zur Expression von Luziferase.....	52
4.2.23.1.3	Homologe Rekombination in Bakterien (pAdEasy-1/BJ5183).....	52
4.2.23.1.4	Produktion von Viren in HER-911-Zellen.....	53
4.2.23.1.5	Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks.....	53
4.3	Arbeiten mit Proteinen.....	54
4.3.1	Ernte von Zellen für anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
4.3.2	Biotinylierung von Proteinen der Zelloberfläche.....	54
4.3.3	Immunpräzipitation.....	54
4.3.4	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
4.3.5	Western Blot.....	56
4.3.6	Ponceau S-Färbung von Western Blots.....	56
4.3.7	Immunfärbung des Blots.....	56
4.3.8	Nachweis biotinylierter Proteine auf Nitrozellulose.....	57
4.3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	58
4.3.10	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Biuret-Reaktion.....	58
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
5.1	Herstellung fusionsfähiger adenoviraler 1 <sup>st</sup> Generations-Vektoren.....	59
5.1.1	Die Herstellung von den fusionsfähigen, adenoviralen 1 <sup>st</sup> Generations-Vektoren Ad CMV F&H und Ad MLP F&H kann im Kontext der Fusion erfolgen.....	59
5.2	Charakterisierung des 1 <sup>st</sup> Generations-Vektor Ad CMV F&H.....	62
5.2.1	Expression von F- & H-Fusionsproteinen des adenoviralen Vektors Ad CMV F&H und ihre Auswirkung auf die Zellmorphologie im Vergleich zu einem nicht-fusionsfähigen Vektor, Ad CMV βGal.....	62
5.2.2	Zytotoxizität der adenoviralen Vektoren Ad CMV F&H und Ad CMV βGal auf HER-911- bzw. 293 Zellen in einem bi-dimensionalen Modell.....	65
5.2.3	Einfluss der Fusion auf die Replikation von adenoviralen 1 <sup>st</sup> Generations-Vektoren.....	69
5.3	Etablierung eines Koinfektionsmodells mit fusionsfähigen Vektoren.....	71
5.3.1	Koinfektionsmodell eines replikationsfähigen Adenovirus (Ad dl 309) in Kombination mit fusions- und nicht-fusionsfähigen 1 <sup>st</sup> Generations-Vektoren (Ad CMV F&H bzw. Ad CMV βGal). .....	71
5.3.2	Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem E4-deletierten Virus (Ad dl 366) und einem 1 <sup>st</sup> Generations-Vektor (Ad CMV F&H oder Ad CMV βGal) in H1299-Zellen .....	74
5.4	Einfluss der Fusion auf die Molekularbiologie adenoviraler Vektoren.....	85
5.4.1	Einfluss der Fusion auf die Expression adenoviraler Gene.....	85
5.4.2	Einfluss der Fusion auf die Transgen-Expression adenoviraler Vektoren.....	88
5.4.3	Einfluss der Fusion auf die DNA-Replikation adenoviraler Vektoren .....	91

5.5	Untersuchung der intrasynzytiellen Virusausbreitung.....	92
5.5.1	Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz.....	93
5.5.2	Abschätzung einer potentiell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH).....	99
5.6	Expression der Fusionsproteine in der späten phase der Adenovirus-Replikation..	106
5.6.1	Charakterisierung der Expression von Transgen-Produkten unter der Kontrolle eines adenoviralen MLP-Promotor (Major Late Promoter) .....	106
5.6.2	Einfluss der MLP-Promotor-Aktivität auf die Transkription von Fusionsproteinen.....	108
5.6.3	Wirkung der MLP-Promotor-Aktivität auf die Synthese von Fusionsproteinen ....	110
5.6.4	Einfluss des MLP-Promotors auf die Synthese von Fusionsproteinen und seine Auswirkung auf die Entstehung der Synzytien .....	111
5.6.5	Einfluss der unter MLP-Promotor gesteuerten Fusion auf die Replikation von 1 <sup>st</sup> . Generations-Vektoren .....	113
5.6.6	Zytotoxizität des adenoviralen Vektor Ad MLP F&H auf HER-911-Zellen in einem bi-dimensionalen Modell.....	115
5.6.7	Untersuchung der Fusionsaktivität von 1 <sup>st</sup> . Generations-Vektoren in Abwesenheit adenoviraler Replikation .....	117
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>119</b>
6.1	Herstellung fusionsfähiger adenoviraler 1 <sup>st</sup> .Generations-Vektoren, die die Masernvirus-Proteine F und H exprimieren.....	119
6.2	Zytotoxizität und Replikation fusionsfähiger Vektoren .....	121
	Vorschläge zu einer möglichen Anwendung.....	121
6.3	Die adenovirale Replikation in Synzytien: Einfluss der Fusion auf die Aktivität adenoviraler Vektoren .....	123
6.4	Ausbreitung von Adenoviren innerhalb eines Synzytiums .....	125
6.5	Strategien zur Erzielung einer von der Virusreplikation abhängigen Fusion .....	131
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>133</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>144</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>146</b>
	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>149</b>
	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....</b>	<b>152</b>



# Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus
ADP	Adenovirus Death Protein
BSA	Bovine Serum Albumine
CMV	Cytomegalievirus Promoter
DABCO	1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DBP	DNA-bindendes Protein
dl	Deletion tragendes Adenovirus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
env	Retrovirales Env-Protein
E1A	frühes, adenovirales Protein
E1B-55kDa	frühes, adenovirales Protein
E2	Ubiquitin-Konjugierendes Enzym
E2A	frühes, adenovirales Protein
E2F	heterodimerer Transkriptionsfaktor
E4orf6	frühes, adenovirales Protein
E4orf3	frühes, adenovirales Protein
F	Masernvirusprotein-F
FCS	fetal calf serum
f.f.u.	fluorescence forming units
FIP	Fusionsinhibierendes Peptid
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
GFP	Green Fluorescent Protein
H	Masernvirusprotein-H
HA	Hämagglutinin
IRES	internal ribosomal entry site
L	spätes, adenovirales Protein
LITR	left inverted terminal repeat
Luc <sup>+</sup>	Luziferase
MLP	Adenoviraler später Promoter (Major Late Promoter)
m.o.i.	multiplicity of infection
OD <sub>590</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 590 nm
pAd	Adenovirales Plasmid
p.i.	post infection
pRb	Retinoblastomprotein
PSA	prostate specific antigen
RITR	right inverted terminal repeat
RLU	Relative Luziferase Einheiten (relative luciferase units)
rpm	rounds per minute
RZ	E2A(DBP)-Replikations-Zentren
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
VA-RNA	virus-associated RNA

# 1 Zusammenfassung

Adenovirus-Vektoren können zur Expression von Fusionsproteinen eingesetzt werden, um neue Strategien zur Beseitigung maligner Tumoren zu entwickeln. Dazu ist zunächst zu klären, wie eine Fusion infizierter Zellen die Replikation und Zytotoxizität onkolytischer Adenoviren beeinflusst. Um diese Fragen zu beantworten, wurden in dieser Arbeit adenovirale Vektoren hergestellt (1<sup>st</sup> Generations-Vektoren), die beide Masernvirusproteine, F und H, gleichzeitig exprimieren. Die Infektion von permissiven Zellen mit diesen Vektoren verursacht die Erzeugung von Synzytien. Dabei bleibt die Replikation der Adenoviren im Kontext einer von der Fusion erhöhten Zytotoxizität ungestört, und die Expression von adenoviralen- und trans-Genen wurde von der Synzytienbildung nicht beeinträchtigt. Sowohl frühe als auch späte adenovirale Proteine wurden von allen Kernen eines Synzytiums importiert. Um eine mögliche Infektion benachbarter Kerne durch eine intrasynzytielle adenovirale Ausbreitung zu untersuchen, wurde eine FISH-Analyse mit adenoviralen DNA-Sonden durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass die Replikation während des Infektionsverlaufs nur in einem einzigen Kern des Synzytiums erfolgt. Die Anwendung des MLP-Promoters zur Expression von F- und H-Protein ermöglicht schließlich eine von der Replikation abhängige Expression der Fusionsproteine und somit eine selektive Steuerung der Zytotoxizität.

Diese Arbeit zeigt, dass fusionsfähige Adenoviren zur Expression ihrer Genprodukte und zur Replikation ohne Einschränkung in der Lage sind. Ihre erhöhte Zytotoxizität kann dabei durch geeignete Wahl des Promoters auf Tumorzellen fokussiert werden. Zellfusion hat damit das Potenzial, onkolytische Adenoviren in ihrer Wirkung wesentlich zu verstärken.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Biologie der Adenoviren

#### 2.1.1 Überblick

Adenoviren sind kleine, ikosaedrisch gebaute Capside ohne Membranhülle (80-110nm). Sie wurden 1953/1954 parallel von zwei Arbeitsgruppen erstmals isoliert (*Rowe et al., 1953; Hilleman und Werner, 1954*). Da diese Viren aus Tonsillen und adenoidem Gewebe isoliert wurden, hat J.F. Enders das mit „adenoid“ verbundene Wort „Adenoviren“ als Bezeichnung für diese neu entdeckten Viren eingeführt (*Enders et al., 1956*).

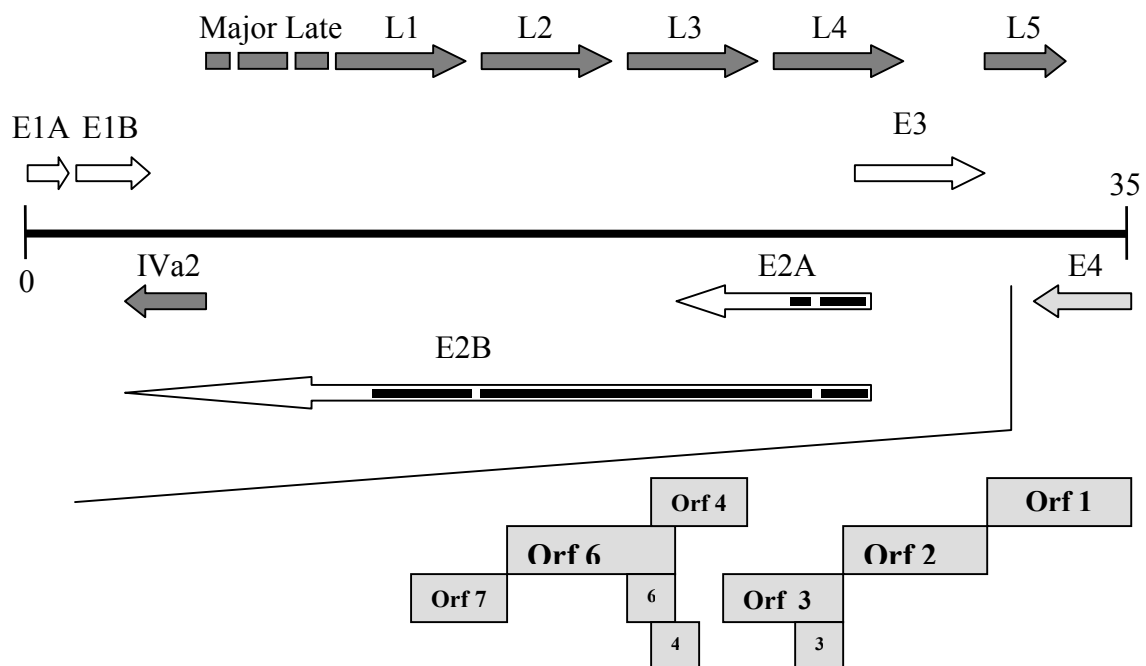
Die Adenoviren können in Mastadenoviren und Aviadenoviren eingeteilt werden, wobei die Ersteren Erkrankungen bei Säugetieren und die Zweiten Krankheiten bei Vögeln hervorrufen. Adenoviren verursachen bei Menschen hauptsächlich Erkrankungen der Atemwege, des gastrointestinalen Bereiches und der Bindehaut des Auges, wobei 50% der Infektionen symptomlos verlaufen. Etwa 40 verschiedene human-pathogene Adenoviren sind bisher bekannt und in sechs Subgenera (A bis F) untergliedert. Kriterien für diese Einteilung sind DNA-Homologien, Tumorbildungsfähigkeit in Nagetieren, die Zielorgane ihrer Infektionen, sowie Eigenschaften ihrer Capsidstruktur (Tabelle 2.1) (*Shenk, 1996; Falke und Modrow, 1997*).

Subgenus	Virustypen	Zielorgane	Tumorbildung In Nagetieren	DNA-Homologie (im Subgenus)
<b>A</b>	Ad12, 18, 31	Gastrointestinaltrakt	hoch	49-69%
<b>B</b>	Ad3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Lunge, Pharynx, Bindehaut	mittel	89-94%
<b>C</b>	Ad1, 2, 5, 6	Pharynx	sehr niedrig	99-100%
<b>D</b>	Ad8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47	Bindehaut	sehr niedrig	94-99%
<b>E</b>	Ad4	Respirationstrakt	sehr niedrig	
<b>F</b>	Ad40, 41	Gastrointestinaltrakt	unbekannt	62-69%

Die Serotypen 2 und 5 der humanen Adenoviren (Ad2 und Ad5) lassen sich sehr gut in Zellkultur vermehren und sind daher besonders gut charakterisiert.

Das Genom der Adenoviren besteht aus doppelsträngiger DNA. Je nach Virustyp umfasst es 36.000 bis 38.000 Basenpaare. Die Genprodukte werden nach ihrer zeitlich organisierten Synthese in frühe funktionale Proteine (E1 bis E4) und späte Strukturproteine (L) eingeteilt.

Der Infektionszyklus der Adenoviren lässt sich in vier Phasen einteilen. Zunächst werden die frühen Gene transkribiert und die entsprechenden Proteine hergestellt. Daran schließt sich die Phase der DNA-Replikation an. Nach Beginn der DNA-Replikation werden die Transkripte der späten Gene erstellt und daraus die Strukturproteine synthetisiert. Zum Schluss erfolgt die Morphogenese und Freisetzung der Viruspartikel. In HeLa-Zellen dauert ein solcher Replikationszyklus bis zur Bildung der ersten Viruspartikel etwa 24 Stunden. Die Zahl der Nachkommenviren beträgt ungefähr zehntausend pro Zelle (Shenk, 1996).



**Abb. 2.1: Organisation des Adenovirusgenoms.**

Früh in der Infektion wird als erstes die E1-Region transkribiert, wodurch die E1A- und E1B-Proteine entstehen. Insbesondere E1A ermöglicht dann die Aktivierung weiterer früher Promotoren (E2-E4) und somit die Expression der zugehörigen Genprodukte. Die E4-RNA wird dabei in entgegengesetzter Richtung zur E1-RNA abgelesen. Durch Spleißen entstehen aus der E4-Vorläufer-mRNA sieben verschiedene mRNA-Moleküle, welche in ebenso viele Proteine translatiert werden. Nachdem das Virusgenom repliziert worden ist, wird die späte Region (L) transkribiert und durch differentielles Spleißen entstehen fünf verschiedene Genprodukte (L1-L5).

## 2.1.2 Die Struktur der Viruspartikel

Viruspartikel bestehen aus strukturellen Capsid-Bauteilen namens *Capsomere*. Ein Viruspartikel enthält 250 *Capsomere*. Von diesen sind 240 *Hexone*, die die Flächen des Ikosaeders gestalten, die zwölf übrigen sind *Pentone*, die die Ecken der Struktur bilden. *Hexone* bestehen aus Trimeren des Hexonproteins (II-120kDa) (Abb. 1.1).

Pentone bestehen aus einem Pentonbasisprotein, das ein Pentamer des viralen Strukturproteins III (80 kDa.) ist. Fiberproteine, die aus der Oberfläche des Partikels hervorragen, sind mit den Pentonen assoziiert und bilden die „Spikes“ des Adenovirus. Diese Proteine besitzen an ihrem

Ende eine knopfförmige Struktur, „Knob“, die für die Wechselwirkung mit dem zellulären Rezeptor-CAR (*coxackie adenovirus receptor*) verantwortlich ist. Jedes Fiberprotein besteht aus einem trimeren Proteinkomplex (IV-62kDa).

Pentone und Hexone werden durch das pentonassoziierte Protein (IIIa) verbunden. *Hexonassoziierte Proteine* verbinden die *Hexone* miteinander (IX, X, XI und XII).

Im Inneren des Partikels befindet sich das lineare doppelsträngige DNA-Genom, das mit den Proteinen V, VII und X zu einer Core-Struktur komplexiert ist.

### 2.1.3 Funktion früher und später adenoviraler Genprodukte

Die Adenovirusinfektion kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Als die frühe Phase bezeichnet man die Zeit vor Beginn der viralen DNA-Synthese; als späte Phase entsprechend die Zeit nach Beginn der viralen DNA-Synthese. Die viralen Proteine werden, analog dazu, frühe (E1, E2, E3 und E4) und späte (L1) Proteine genannt (Abbildung 2.1).

#### Frühe adenovirale Proteine:

Die E1-Proteine stellen die Gruppe der sehr früh exprimierten Proteine (immediate early genes) dar. Es wurde beschrieben, dass diese Proteine für die onkogene Transformation in Nagetieren verantwortlich sind. Das E1A-Protein bindet an den zellulären Tumorsuppressor pRb (Retinoblastoma-Protein) und verhindert dessen Interaktion mit den Proteinen der E2F-Familie. E2F ist nun in der Lage, die zelluläre und virale Transkription zu aktivieren, so dass es zum Übergang aus der Ruhephase (G0/G1) in die Synthesephase (S) kommt (*Jones, 1992*). Das E1B-55 kDa Protein interagiert dagegen mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 (*Sarnow et al., 1982a; Sarnow et al., 1982b*). Es bindet an p53 und relokalisiert es aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wo es degradiert wird. Somit kann p53 seine Funktion des Zell-Zyklus-Arrests und der Apoptose-Induktion nicht mehr wahrnehmen. Analog hierzu gibt es weitere Proteine von Tumoviren mit gleicher Funktion. So haben die Proteine E6 und E7 des Humanen Papilloma Virus und das große T-Antigen des SV40 ähnliche Funktionsmechanismen.

Das E2A-Gen codiert für ein 72kD-Protein, das im aminoterminalen Bereich stark phosphoryliert ist und sich an einzelsträngige DNA binden kann. Dieses Protein wird E2A(DBP) (*DBP=DNA-bindendes Protein*) genannt. Es lagert sich bei der Replikation der viralen DNA an die DNA-Einzelstränge, die durch die Neusynthese verdrängt werden und verhindert, dass diese Einzelstränge doppelsträngige Strukturen ausbilden. Darauf aufbauend

werden DNA-Stränge und E2A-Proteine komplexiert. Folglich kommt es zu einer Akkumulierung dieser Proteine im Rahmen einer aktiven Replikation. Die DNA-Replikation erfolgt nicht im ganzen Kern, sondern nur in den Bereichen, in welchen sich adenovirale DNA befindet. So wird das E2A(DBP)-Protein sich nun heterogen auf diese bestimmten Areale des Kernes konzentrieren. Auf Grund dessen werden diese Proteine in der Immunfluoreszenz eine Granula-ähnliche Konformation bilden, die als „Replikationszentren“ (RZ) bezeichnet wurde (Abbildung 5.22c, „RZ“).

Die E2B-Region codiert für zwei Proteine. Eines besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa und ist das Vorläuferprotein pTP für das im infektiösen Virus an die 5'-Ende des Genoms gebundene *terminale Protein* (TP), von dem bei der Morphogenese eine virale Protease das TP (55 kDa) abspaltet. Das zweite Protein stellt die *virale DNA-Polymerase* (140kDa) dar (Falke & Modrow, 1997).

Die E3-Region enthält Sequenzen zur Expression einiger relativ kleiner Proteine, die für die Adenovirusreplikation nicht wesentlich sind. Die E3-Produkte spielen dennoch eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation und Entstehung persistierender Adenovirusinfektionen (Wold et al., 1991). So interferiert das E3-19 kDa-Protein mit der normalen Glykosylierung von MHC-Klasse-I-Proteinen, was zu ihrer Inaktivierung führt. Dadurch sind die MHC-I-Proteine nicht mehr in der Lage, an der Oberfläche der infizierten Zellen Antigene zu präsentieren. Folglich kann eine zytotoxische T-Zell-Immunantwort vermieden werden. Dabei macht ein anderes E3-Produkt die infizierten Zellen für eine TNF- $\alpha$  vermittelte Lyse unempfindlich (E3-14,7kDa). Das E3-10,4kDa-Protein bindet sich in einem autokrinen Mechanismus an den EGF-Receptor (*epidermal growth factor*) und vermittelt den Zellen das Signal zur Proliferation bzw. zum Eintritt in den Teilungszyklus. Ein anderes E3-Protein (E3-11.6kDa) wird in einer sehr späten Phase der Adenovirusinfektion exprimiert (Burgert & Blusch, 2000). Dieses E3-Produkt - auch genannt „*Adenovirus Death Protein*“ (ADP) - ist ein transmembran-haftendes Protein, das im endoplasmatischen Reticulum, Golgi-Apparat und in der Kernmembran lokalisiert ist. Es fördert die Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle (Tollefson et al., 1996a; Tollefson et al., 1996b).

Adenovirale E4-Proteine spielen eine Rolle bei der Expression, Lokalisierung und Aktivität anderer adenoviraler Proteine. Das E4-34kD-Protein (Abb. 2.1, E4orf6), z.B., fördert in Wechselwirkung mit dem E1B-Protein den Transport später viraler mRNA-Spezies aus dem Zellkern in das Cytoplasma und hemmt den Transport der zellulären Transkripte (Sarnow et al., 1984). Hierdurch nimmt die Synthese zellulärer Proteine mit fortschreitender Virusreplikation ab (Babiss et al., 1985; Beltz et al., 1979; Pilder et al., 1986). Das E4/14kD

(Abb. 1.1, E4orf4) wirkt als Phosphatase und beeinflusst das Ausmaß der Phosphorylierung einiger zellulärer Proteine (zum Beispiel c-Fos und AP-1) und der viralen E1A-Proteine (Muller *et al.*, 1992). Ein anderes Protein, E4/17kD, bindet sich an E2F-Faktoren. Es verstärkt die Bindung dieser Transaktivatoren an die viralen, E2F-abhängigen Promotoren und führt so zu einer höheren Transkriptionsrate (Hardy *et al.*, 1989; Reichel *et al.*, 1989). E2F ist ein zellulärer, Sequenz-spezifischer, DNA-bindender Faktor. E1A kann ebenfalls die Expression von E4 stimulieren und es wurden bereits E1A-Faktoren identifiziert, die mit spezifischen Sequenzen innerhalb des adenoviralen E4-Promotors interagieren können (Engel *et al.*, 1988). Dementsprechend üben beide Faktoren miteinander eine synergistische Aktivität aus, die in der Transaktivierung anderer früher adenoviraler Proteine eine sehr wichtige Rolle spielt. Die Expression adenoviraler E2-Proteine hängt von der trans-aktivierenden Aktivität von E1A in Zusammenarbeit mit E4/17kD ab (Reichel *et al.*, 1989). Nur auf diese Art wird die Affinität des E2F-Faktors zu adenoviralen Promotoren modifiziert. Dementsprechend kann die Trans-Aktivierung der E2-Transkription erfolgen.

### **Späte adenovirale Proteine:**

Die späten Virusproteine sind fast ausnahmslos Strukturproteine und werden in der späten Phase der Adenovirusinfektion unter der Stimulierung des *späten adenoviralen Promoters* (MLP-Promoter) transkribiert. Die Aktivierung dieses Promoters benötigt eine Wechselwirkung mit mehreren Faktoren, die nach dem Beginn der DNA-Replikation von dem Adenovirus stark exprimiert werden; z.B. IVa2 und IX (Crossland *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1980; Binger *et al.*, 1984; Fessler und Young, 1998; Lutz und Keding, 1996). Folglich steigt die Aktivität dieses späten Promoters und so die darauffolgende Expression adenoviraler später Proteine (Brunet *et al.*, 1987; Logan und Shenk, 1986; Lu *et al.*, 1997; Reach *et al.*, 1990; Reach *et al.*, 1991).

#### **2.1.4 Die Morphogenese der Viruspartikel**

Im Cytoplasma werden die Hexon-, Pentonbasis- und Fiberproteine synthetisiert. Diese Genprodukte bestimmen die Struktur der Capsomere. Hierzu ist allerdings die Aktivität von Chaperon-Faktoren erforderlich, welche die Faltung und Polymerisation dieser Proteine katalysieren. Diese Chaperon-Faktoren, XII-33kDa und XII-100kDa genannt, werden vom Virus kodiert. Andere Proteinfaltungskatalysatoren mit ähnlicher Funktion sind in der Zelle selbst vorhanden und tragen ebenfalls zur Formung der Capsomere bei. Dementsprechend werden Hexonproteine durch die Chaperon-Aktivität trimerisiert und in *Hexoncapsomere*

geformt. Die Capsomere werden dann in den Kern importiert, wo die Morphogenese und anschließende Encapsidierung des adenoviralen Genoms erfolgen kann. Innerhalb des Kernes assemblieren sich Hexone und Pentone zur Vorläuferform des Capsides. Die adenoviralen Nucleoproteine V und VII werden in die Capside inkorporiert und komplexieren dann mit dem bereits encapsidierten Genom. Wie die Morphogenese und Encapsidierung des adenoviralen Genoms anläuft, ist bisher nicht vollständig bekannt.

## **2.2 Adenoviren in der onkolytischen Tumorthherapie**

### **2.2.1 Stand der Forschung**

Es wurde schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts über eine spontane Rückbildung von Tumoren in Zusammenhang mit einer Virusinfektion des Patienten berichtet. 1956 wurden Wildtyp-Adenoviren das erste Mal im Rahmen einer klinischen Studie in Cervix-Karzinome injiziert und eine darauffolgende Tumornekrose als Effekt dieser Anwendung festgestellt (*Smith et al., 1956*). Zu diesem Zeitpunkt entstand das Konzept der virusvermittelten Onkolyse, auch „Virustherapie“ genannt. Durch die erfolgreiche Entwicklung anderer vielversprechender Tumorthapien, wie z.B die Chemotherapie, ist die Anwendung der Virustherapie vorübergehend in Vergessenheit geraten. In den sechziger und siebziger Jahren wurden Adenoviren erneut in Tumoren angewendet (*Yohn et al., 1968; Zielinski & Jordan, 1969*).

Seit 1980 werden onkolytische Adenoviren hergestellt, in welchen die E1-Region des Adenovirusgenoms durch eine Kasette zur Expression von Transgenen ersetzt wurde. Die E1-Deletion macht diese Vektoren replikationsunfähig. Da diese rekombinanten Adenoviren Transgene exprimieren, wurden sie als „Adenovirale Vektoren“ bezeichnet. Viren dieser Art wurden zur Behandlung verschiedener Pathologien entwickelt, Krebs inklusive. Ein Beispiel dafür ist die Herstellung von adenoviralen Vektoren, die den Tumor-Suppressor p53 oder Faktoren zur Zellproliferation (p16INK/CDKN2) exprimieren (*Sandig et al., 1997*). Die Replikationsunfähigkeit jener Vektoren hat allerdings eine wirksame Ausbreitung der Viren im Tumorgewebe verhindert und folglich kam es zu einem Stillstand in der Entwicklung von adenoviralen Vektoren (*Lang et al., 2000*).

Zwischen 1996 und 1997 wurden die ersten Schritte zur Entwicklung von konditionalreplizierenden Adenoviren durchgeführt. Hierzu wurden Adenoviren so verändert, dass sie ausschließlich in Tumorzellen replizieren sollten. Das Virus dl1520 – auch genannt ONYX015- weist eine Deletion des E1B-55kDa-Gens auf, das den Antagonismus des



entsprechenden Genprodukts zum Tumorsuppressor p53 aufheben sollte (*Bischoff et al., 1996*). Das ONYX015-Virus wurde in vorklinischen bzw. klinischen Studien angewendet. Eine andere Strategie beruht auf der Ersetzung des E1-Promoters mit anderen zellulären Promotoren, die in der Anwesenheit von Tumorfaktoren stimuliert sein können. Entsprechend wurden Adenoviren zur gezielten Replikation in Prostatakarzinomen erzeugt, die den Promoter des „Prostata-Spezifischen-Antigens“ (PSA) enthalten (*Rodriguez et al., 1997*).

In den letzten Jahren hat die Entwicklung von neuen onkolytischen Adenoviren eine sehr wichtige Anzahl von Publikationen ergeben. Viele von denen erreichen neue klinische Studien, in denen ihre Wirksamkeit und Sicherheit überprüft wird.

### **2.2.2 Erzeugung rekombinanter Adenoviren**

Sowohl Deletionen und Mutationen des adenoviralen Genoms als auch die Anwendung tumorspezifischer Promotoren und die Verwendung von onkolytischen Transgenen stellen diverse Strategien zur Erzielung effizienter und spezifischer Adenoviren dar. Die Entwicklung neuer Strategien zur virusvermittelten Onkolyse und ihrer Charakterisierung benötigt die Anwendung von replikationsfähigen und nicht-replikationsfähigen Adenoviren.

Rekombinante nicht-replikationsfähige Adenoviren können durch Deletion der für die Replikation essentiellen Regionen des Adenovirusgenoms und Ersetzung mit einem Transgen hergestellt werden. Wenn diese rekombinanten Adenoviren eine Deletion von nur einer Region tragen (z.B. E1- bzw. E4-Region), werden sie als 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren bezeichnet. Diejenige, die eine Deletion von zwei essenziellen Regionen aufzeigen, werden als 2<sup>nd</sup> Generations-Vektoren bezeichnet. Diese rekombinanten Adenoviren sind nur zur Replikation fähig, wenn sie Zellen infizieren, in welchen eine konstitutive Expression dieser dem Adenovirus fehlenden Genprodukte die Adenovirus-Aktivität komplementiert. Auf diese Art ist die Replikation von E1- bzw. E4-deletierten 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren nur in transformierten Zellen möglich, in denen die E1- bzw. E4-Proteine synthetisiert werden. Zellen dieser Art wurden zur Expression dieser Genprodukte so hergestellt, dass eine homologe Rekombination zwischen den in der Zelle vorhandenen Adenovirus-DNA-Sequenzen und den adenoviralen Vektoren nicht erfolgen kann (*Brough et al., 1996; Gao et al., 2000; Zhou et al., 1996*).

Bei der Herstellung replikationsfähiger rekombinanter Adenoviren können Transgene in der E3-Region des adenoviralen Genoms einkloniert werden. Die E3-Region der Adenoviren ist für die Virusreplikation nicht essentiell (*Berkner et al., 1983; Saito et al., 1985; Wold et al., 1995*) und ihre Deletion (partial oder total) ermöglicht eine Insertion von Sequenzen zur

Expression von Transgenen (*Dewar et al., 1988; Hawkins & Hermiston, 2001a; Hawkins & Hermiston, 2001b; Hawkins et al., 2001*).

### 2.2.3 Die Verbesserung der Effizienz, ein Hauptziel

Onkolytische Adenoviren eignen sich unter bestimmten Voraussetzungen zur Therapie von soliden Tumoren. Zwei Ziele stehen im Mittelpunkt, um den Ansatz der Virustherapie weiter zu verbessern: Einerseits muss versucht werden, eine möglichst weitgehende Selektivität der Virusreplikation für Tumorzellen zu erreichen, d.h. einen Befall des umliegenden Normalgewebes zu verhindern. Hierzu gibt es bereits vielversprechende Ansätze. Gleichzeitig ist es aber auch nötig, die Effizienz der Virusvermehrung zu optimieren, damit möglichst viele Tumorzellen zerstört werden können. Somit muss die Zytotoxizität dieser Vektoren durch verschiedene Strategien gesteigert werden.

Die Verwendung des replikationskompetenten Virus ONYX015 erbrachte bei der Behandlung von Patienten mit Tumoren des Hals- Nasen und Ohrenbereiches („head and neck cancer“) bereits messbare klinische Erfolge (*Khuri et al., 2000; Lamont et al., 2000; Neumanaitis et al., 2000*). Beobachtet man die klinischen Ansätze von ONYX015 lässt sich feststellen, dass dieses Virus bei weitem nicht das Optimum in der Eliminierung von Tumoren darstellt. Diese onkolytischen Adenoviren breiten sich nur wenige Millimeter neben dem Stichkanal aus. Um eine befriedigende therapeutische Antwort zu erreichen, wurde den Patienten mehrfach Virus appliziert. Die Injektions-Technik erforderte die tomographische Einteilung der Tumormassen in Quadranten, in die individuell Viren injiziert wurden (*Ganly et al., 2000*). Sogar Patienten, die im Rahmen der Virustherapie von ONYX015 chemotherapeutisch behandelt wurden, benötigten eine mehrfache und intensive Verabreichung der Viren durch multiple Injektionen, um eine merkbare Rückbildung der Tumormassen zu erreichen (*Khuri et al., 2000*). Bisher konnte das Hindernis der uneffizienten Virusausbreitung in Tumoren nicht gemeistert werden. Die Verbesserung der Effizienz bzw. Zytotoxizität der onkolytischen Adenoviren stellt immer noch eine interessante Herausforderung dar.

## 2.3 Die Zellfusion als Strategie für eine bessere Tumorzerstörung

Die Fähigkeit viraler Membranproteine zur Steigerung der Zytotoxizität durch Zell-Zell-Fusion ist längst bekannt (*Poste, 1970; Marsh and Helenius, 1990; White, 1990; White, 1992*). Fusionsproteine werden von verschiedenen Viren exprimiert, wie Influenzaviren (*Huang, 1985*), Newcastlevirus (*Reichard et al., 1992; Lorence et al., 1994*), Masernviren

(Schattner *et al.*, 1985), Vesicular-Stomatitis-Viren (Moller *et al.*, 1985; Schattner *et al.*, 1985, Mastromarino *et al.*, 1987) und dazu Retroviren (Dewar *et al.*, 1989; Freed *et al.*, 1990; Hunter and Swanstrom, 1999), insbesondere die C-Typ-Retroviren, wie das GALV-Virus (gibbon ape leukemia virus) (Forestell *et al.*, 1997). Viren der Paramyxoviridae-Familie wurden schon in der Tumorthherapie angewendet, um Onkolyse zu induzieren und eine Immunantwort gegen die Tumorzellen anzuregen (Sinkovics und Horvath, 1993; Asada, 1974; Lorence *et al.*, 1994).

Einen neuen Ansatz stellt die Expression von rekombinanten Fusionsproteinen von Plasmiden und viralen Vektoren dar (Bateman *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2000; Fielding *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2000; Galanis *et al.*, 2001). Es fiel hier auf, dass die von Plasmiden und Vektoren exprimierten Fusionsproteine ihre biologischen Aktivitäten intakt erhalten. Dies hat das Interesse an den Fusionsproteinen als Antitumor-Agenzien gesteigert. Als immunologische Anregungsagenzien verursachten die Fusionsproteine eine Induktion von zwei Hitze-Schock-Proteinen (Bateman *et al.*, 2000, Grote *et al.*, 2001). Diese Hitze-Schock-Proteine steigern die Immunantwort gegen Tumore (Tamura *et al.*, 1997; Melcher *et al.*, 1998). Darüber hinaus hat die Bildung von Synzytien einen direkten abtötenden Effekt auf die beteiligten Zellen gezeigt (Bateman *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2000; Galanis *et al.*, 2001).

Außer Newcastle- und Masern-Viren wurden bisher keine anderen fusionsfähigen Viren in klinischen Studien angewendet.

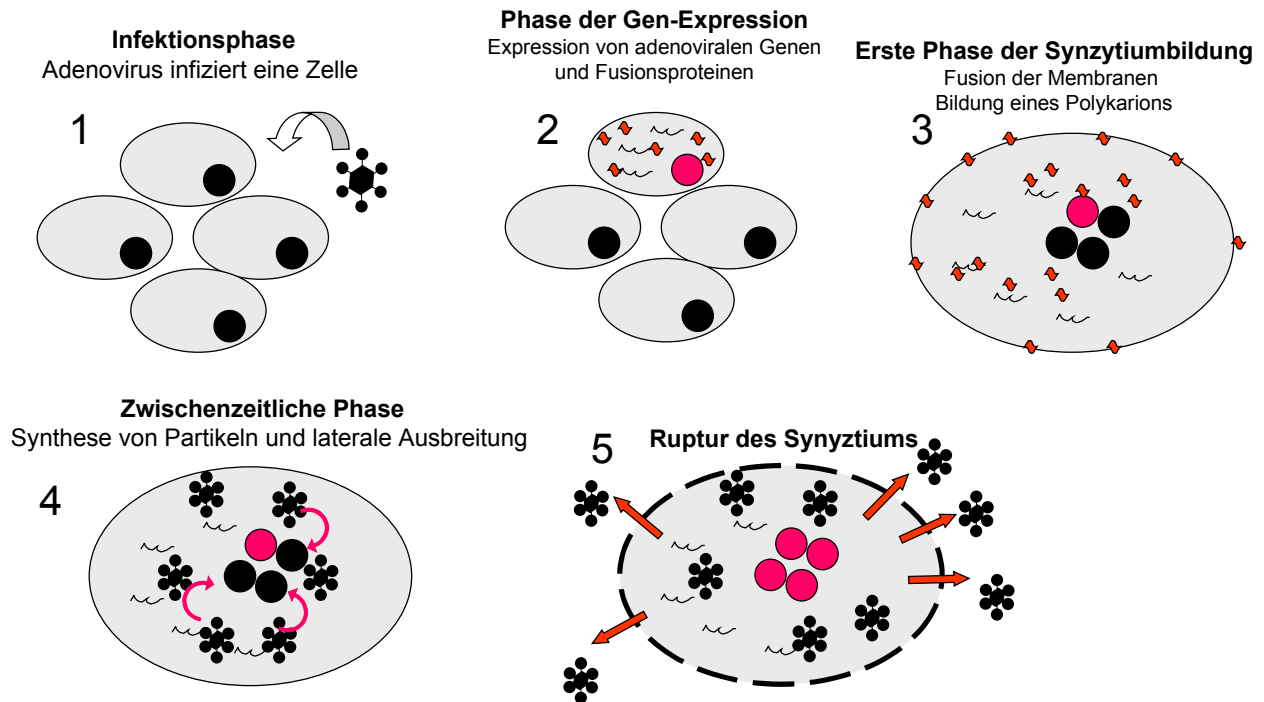
### **2.3.1 Bisherige Charakterisierung fusionsfähiger Adenoviren**

Wie bereits erläutert, können Fusionsproteine von viralen Vektoren exprimiert werden.

Adenovirale Vektoren sind auch in der Lage diese Fusionsproteine zu exprimieren und es gibt bisher wenige Publikationen, die das onkolytische Potenzial fusionsfähiger Adenoviren und den Einfluss der Fusion auf die Biologie der Adenoviren untersucht haben. Ein Beispiel dafür ist die Publikation von E. Galanis und Mitarbeitern (Galanis *et al.*, 2001), in welcher adenovirale Vektoren zur Expression von F- und H-Masernvirus-Fusionsprotein hergestellt und in Xenograph-Tumoren von Mäusen charakterisiert wurden. Da die Klonierungskapazität dieser Vektoren die Platzierung beider Fusionsproteine in der E3-Region nicht erlaubt, wurden hier zwei Adenoviren kloniert, die jeweils nur eines von beiden Proteinen enthielten: ein AdF- und ein AdH-Virus (Bett *et al.*, 1993). So kommt es nur bei einer Koinfektion mit beiden Viren zur gleichzeitigen Expression der Fusionsproteine, welche an der Zelloberfläche zusammen exprimiert werden müssen, um die Verschmelzung der Zellmembranen auslösen

zu können (*Wild et al., 1991; Malvoisin und Wild, 1993; Caballero et al., 1998, Morrison et al., 1991, Bousse et al., 1994, Bagai et al., 1995, Ward et al., 1995, Hernandez et al., 1996*). Diese Koinfektion hat eine deutliche Rückbildung der Xenograph-Tumoren, verglichen mit einem nicht-fusionsfähigen Adenovirus, gezeigt. Bisher wurden noch keine adenoviralen Vektoren (replikationsfähig bzw. nicht-replikationsfähig) hergestellt oder charakterisiert, die beide Proteine aus einem selben Genom exprimieren.

Ein anderer Ansatz wurde von H. Li und Mitarbeitern präsentiert (*Li et al., 2001*). Hier wurde ein replikationsfähiges Adenovirus namens Ad5HIVenv mit einer Kassette zur Expression des Env-Proteins des HIV-Virus in der E3-Region seines Genoms ausgestattet (*Dewar et al., 1989*). Entsprechend wurden für die Charakterisierung dieses Virus rekombinante Zellen verwendet, die den CD4-Rezeptor an ihren Oberflächen tragen. Das Ziel dieser Analyse war es, den Einfluss der Fusion auf die Biologie der Adenoviren zu beleuchten und die Alternativen einer möglichen Anwendung am Menschen zu untersuchen. Als Schlussfolgerung dieser Untersuchung behaupten die Autoren, dass Adenoviren im Rahmen der Fusion in der Lage sind, sich innerhalb eines Synzytiums auszubreiten und dadurch auch andere benachbarte Kerne dieses Polykarions zu infizieren. Diese Idee schließt das Konzept ein, dass Adenoviren durch ein Synzytium wandern und ihr Genom prinzipiell auch in nicht-infizierte Kerne importiert werden kann (*DNA-delivery*) (Abbildung 2.2).



**Abb. 2.2: Darstellung einer Infektion mit einem fusionsfähigen Adenovirus und ihre zeitlichen Ereignisse nach Hui Li und Mitarbeitern.**

Basiert auf der Abbildung aus der Publikation von Hui Li und Mitarbeitern  
(Li et al., 2001, *Human Gene Therapie*)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nahezu alle Kerne eines von einem einzigen Virus induzierten Synzytiums Partikel enthielten. Aus dieser Beobachtung entstand die Hypothese, dass alle Kerne eines von Adenoviren induzierten Synzytiums eine aktive adenovirale Replikation vorantreiben können. Der Mechanismus zur Auslösung dieses Phänomens wurde von den o.g. Autoren weder untersucht noch vorgeschlagen. Diese Behauptung fordert die bis heute geltenden Dogmen des Adenovirus-Zelleintritts (*Virus entry*) und Kern-DNA-Lieferung (*Adenovirus DNA-delivery*) heraus. Eine effizientere laterale Verteilung von Genprodukten durch das Synzytium und eine bessere Freisetzung der Viruspartikel wurden dabei als vielversprechende Beiträge zur Verbesserung der Effizienz onkolytischer Adenoviren betrachtet.

Die Herstellung dieser fusogenen Vektoren - AdF, AdH und Ad5HIVenv - fand unter Bedingungen statt, unter denen die Fusion der Packaging-Zellen (*Ammen-Zellen*) nicht erfolgen kann. Es ist bisher unbekannt, wie die Fusion der *Packaging-Zellen* die Herstellung eines fusionsfähigen Vektors beeinflussen kann.

## 2.4 Das Masernvirus und seine Fusionsproteine

Das Masernvirus ist ein negativ-strängiges RNA-Virus, das aus einer replikativen Einheit (Genom), einem Ribonukleocapsid und einer Hüllmembran besteht. Die Hüllmembran enthält zwei integrale Membranproteine, das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin (H), sowie ein membran-assoziiertes Matrixprotein (M), welches das Ribonukleocapsid (*Hirano et al., 1993*) und den zytoplasmatischen Teil des F-Proteins miteinander verbindet (*Cathomen et al., 1998; Spielhofer et al., 1998*).

Das H-Protein (Hämagglutinin) ist ein Typ II-Membranprotein mit einer Länge von 617 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 80 kD. Das H-Protein vermittelt die spezifische Adsorption des Masernvirus an die Oberfläche der Zellen. Das verantwortliche Rezeptor-Molekül dieser Bindung sind die Proteine CD46 (*Dorig et al., 1993*) und CD150 (SLAM) (*Cocks et al., 1995; Erlenhöfer et al., 2002*). Eine zusätzliche Funktion des H-Proteins ist es, eine Konformations-Veränderung des F-Proteins im Rahmen der Membranfusion zu induzieren (*Wild et al., 1991, Wild et al., 1994*). Dies führt zu einer funktionellen Aktivierung des F-Proteins, das die Interaktion mit Zellmembranen und die darauffolgende Virus-Zell-Fusion erlaubt (*Caballero et al., 1998*). Um diesen Vorgang zu gewährleisten, ist vermutlich die Wechselwirkung zwischen Ektodomänen beider Proteine erforderlich (*Malvoisin und Wild, 1993*).

Das F-Protein ist ein 554 Aminosäuren langes, glykosyliertes Typ I-Membranprotein, das auf der Oberfläche von infizierten Zellen und in der Virushülle in trimerer Form vorliegt (*Malvoisin et al., 1993*). Die Funktion des F-Protein besteht in der Vermittlung der Fusion von Virushülle und Zellmembran (Wirtszelle) (*Graves et al., 1978*), sowie der Zell-Zell-Fusion. Die Expression des F-Proteins ist alleine nicht dazu fähig, Membranfusion zu induzieren. Dazu ist die gleichzeitige Expression von H-Proteinen erforderlich (*Wild et al., 1991*). Genauso ist eine Prozessierung des Vorläuferproteins F<sub>0</sub> durch eine proteolytische Spaltung in die Untereinheiten F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> essentiell (*Maisner et al., 2000; Nagai et al., 1993*). Durch die Proteolyse des F<sub>0</sub>-Vorläuferproteins wird am Aminoterminus des F<sub>1</sub>-Teils ein stark hydrophober Bereich von circa 25 Aminosäuren exponiert. Er kann die Verschmelzung der Membranen vermitteln (*Hernandez et al., 1996*). Die Insertion dieses Peptides in die Membran der nebenliegenden Zelle führt zu einer räumlichen Verengung zwischen Membranen. Dieser enge Kontakt trägt zur Überwindung von Hydratisierungskräften, einer energetischen Barriere im Fusionsprozess, bei. Er ermöglicht somit die Verschmelzung der äußeren Membranblätter und die anschließende Ausbildung einer Fusionspore (*Moll, 2003; Hernandez et al., 1996*).

## 2.5 Fragestellung

Die Biologie der Adenoviren im Kontext der Zell-Zell-Fusion wurde bisher nicht vollständig untersucht. Wie Adenoviren in einem Synzytium ihre Genprodukte exprimieren und wie die Fusion auf die Aktivität der Adenoviren wirkt, sind noch offene Fragen.

Es ist auch nicht klar, wie die Fusion im Rahmen der Virus-Entstehung die Herstellung neu klonierter fusionsfähiger Adenoviren beeinflussen kann. Bisher wurden fusionsfähige Adenoviren nur so hergestellt, dass sie im Verlauf des *Virus-Packaging* die Fusion der Packaging-Zellen nicht ausgelöst haben.

Adenovirale 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren, die das Masernvirusprotein-F und -H gleichzeitig exprimieren, wurden bisher nicht hergestellt. Es ist bisher noch nicht bekannt, wie sich diese gleichzeitige Expression der Fusionsproteine auf die Zytotoxizität, adenovirale Gen-Expression, Transgen-Expression, sowie DNA- bzw. Virus-Replikation auswirkt.

Adenovirale Proteine werden in dem gemeinsamen Zytoplasma eines Polykaryons synthetisiert. Wie die Expression adenoviraler Genprodukte und ihre Verteilung innerhalb eines Synzytiums erfolgen, wurde bisher nicht beschrieben.

Ebenfalls wurde bisher eine kombinierte Anwendung adenoviraler fusionsfähiger 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren mit anderen Vektoren bzw. konditional replizierenden Adenoviren noch nicht charakterisiert.

Die Ausbreitung von Adenoviren im Synzytium wurde bisher nicht vollständig untersucht. Hui Li und Mitarbeiter behaupten in ihrer Publikation, dass eine Kern-zu-Kern-Ausbreitung innerhalb der Synzytien stattfindet (*Li et al., 2001*). Diese Idee bricht die bisher bekannten Dogmen der Adenovirus-Biologie. Ob Adenoviren tatsächlich innerhalb eines Synzytiums die nebenliegenden Kerne infizieren können und dort eine aktive Replikation vorantreiben, ist weiterhin eine offene Frage.

Die Sicherheit einer Tumor-Therapie mit Adenoviren verlangt eine kontrollierte Expression von zytotoxischen Transgenen. Die Expression der Fusionsproteine soll daher von einer für Tumorzellen selektiven Adenovirus-Replikation abhängen. Strategien zur Erzielung einer spezifischen Zytotoxizität durch Anwendung von Fusionsproteinen wurden bisher nicht angewandt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Antworten auf die hier aufgeworfenen Fragen gesucht.

## 3 Material

### 3.1 Chemikalien

1, 4-Diazabicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO)	Sigma
1, 4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Aceton	Riedel-de Haën, Seelze
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, 29:1)	Bio-Rad
Agarose Electrophoresis Grade	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Albumin Bovine (BSA)	Sigma
Alconox, Detergens	Alconox, Inc., NY, USA
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Avidin-Texas Red	Jackson ImmunoResearch
Biomax MR (Filme)	Eastman Kodak, Rochester, USA
Biotin-Nick Translation Mix (Nick-Translation)	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caesiumchlorid (CsCl)	Boehringer, Mannheim
Chloroform	J.T.Baker, Holland
Ciprofloxacin <sup>®</sup> 200 (Ciprofloxacin)	Bayer, Leverkusen
DAPI	Boehringer, Mannheim
Desoxycholat (DOC)	Sigma
Dextranulphat	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
DNTP-Mix	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA-Größenstandard „1kb ladder“	Gibco BRL, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, 1% Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fluorepre	bioMérieux, Nürtingen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid (deionisiert)	Kodak
Glycogen	Roche Diagnostics, Mannheim



Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Gibco BRL, Paisley, Scotland
H <sub>2</sub> O, RNase-frei	Ambion
Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamin Plus (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Luciferase Lysis Puffer 5x	Promega, Madison, WWI, USA
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
N, N, N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab GmbH
Protein-Größenstandard „RPN 800“	Amersham Life Science
Streptavidin-Peroxidase	Amersham Biosciences, Freiburg
Triton X-100	Sigma
Trizol <sup>®</sup> Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Tween 20	Serva, Heidelberg
Vectashield	Vector-Alexis, Grünberg

### 3.2 Fusionsinhibierendes Peptid (FIP) (Richardson et al., 1980)

Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH (Fusionsinhibierendes Peptid-FIP)	Sigma, Deisenhofen
Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH (Fusionsinhibierendes Peptid-FIP)	Bachem, Bubendorf, Switzerland

### 3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (from calf intestine)	Roche
Expand HIFI Polymerase System	Roche
Expand Long Template PCR System	Roche
Pfu turbo <sup>®</sup> [2,5U/ml]	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase [30 Weiss units/μl]	MBI Fermentas

### 3.4 Kits

#### ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
BCA Protein Assay	Pierce
BIORAD Protein Assay	Bio-Rad
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	peqlab
Luciferase Assay Kit	Promega
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen
DNAeasy Mini Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Superscript™ II RT	GibcoBRL
SuperSignal® West Dura	Pierce

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

12-Loch Zellkulturplatten	Greiner
6-Loch Zellkulturplatten	Greiner
Petrischalen	Greiner
8-Loch Streifen mit Rahmen	Nalge Nunc Int.
Super Frost/Plus® Objektträger	Menzel-Gläser
BIOMAX MR Röntgenfilm	Kodak
Fixogum®	Marabuwerke, Tamm
Fluro Nunc Module Maxi Sorp (Mikrotiterplatte)	Nalge Nunc Int.
Gel-Blotting-Papier GB002 (Whatman-Papier)	Schleicher & Schuell
Gene Pulser Küvetten 0,1 cm	BioRad, München
Kammer-Objektträger LabTEK®	Nalge Nunc Int.
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago, IL, USA
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp®	PE Biosystems
PROTRAN <sup>R</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen (162 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 30 cm <sup>2</sup> )	Greiner

### 3.6 Antikörper

#### Primärantikörper

	<b>Verd.</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-E2A(DBP) (B6-6)	(1:100) W.Blot (1:20) IF	Maus monoklonal Hybridomaüberstand	Jane Flint, Princeton University
Anti-Lamin B	(1:30 000)	Maus monoclonal	Zymed
Anti-E1A (M73)	(1:20) IF	Maus monoklonal	Oncogene™ Research Products
Anti- Ad Hexon	(1:200) W.Blot (1:20) IF	Ziege polyklonal	Biogenesis
Anti- Masernvirus-Protein- H (mAk K83)	(1:100) W.Blot	Maus moklonal	Dr. Markus Moll Inst. für Virologie Uni-Marburg
Anti-Ad Knob-Protein (1D6.14)	(1:200) Infektions- Neutralisierung	Maus monoklonal	Dr. Joane Douglas University of Alabama

#### Sekundärantikörper

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse

IgG (H+L) [Verd. 1:20 000]

Jackson ImmunoResearch

Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment

Donkey Anti-Rabbit [Verd. 1:20 000]

Jackson ImmunoResearch

Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat

IgG (H+L) [Verd. 1:20 000]

Jackson ImmunoResearch

FITC-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat

IgG (H+L) [Verd. 1: 100]

Jackson ImmunoResearch

Alexa Fluor® 594 Ziege anti-Maus IgG (H+L)

[Verd. 1:20]

Molecular Probes

Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus IgG (H+L)

[Verd. 1:20]

Molecular Probes

### 3.7 Oligonukleotide

Alle Primer synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg.

(Orientierung 5'→3'; Restriktionsschnittstellen unterstrichen)

<b>F&amp;H PmeI hin</b>	GAA TTC <u>GTT TAA ACG</u> ATC CTG AGA ACT TCA GGG TGA G
<b>F&amp;H rück</b>	GGC AGA GGG AAA AAG ATC AGC TTG
<b>HA hin für RT</b>	GGC CTG AGG ACA CCT CAG AGA TTC ACT GAC C
<b>HA rück für RT</b>	GCT GCTCAG ATT AGG CTT TTC CAC
<b>HA RT Primer</b>	GTA CAT GCT CAG TTG TGA CAA CTC TG
<b>Ad5VARNAlI back Seq</b>	CCT GCA TGT CTG CCG CTG C
<b>Ad5 VARNA Seq</b>	ACC TGG ACA TCC AGG TGA TG
<b>Ubiquitin C RT</b>	ACT GGG CTC CAC CTC AAG GGT GAT
<b>Ubiquitin C hin</b>	GTC GCA GCC GGG ATT TGG GTC GCG
<b>Ubiquitin C rück</b>	GTC TTG CCA GTG AGT GTC TTC ACG
<b>pAdTrack MLP seq</b>	CGT TCG TCC TCA CTC TCT TCC GCA AGC TT
<b>pAdTrack CMV seq</b>	CAG ATC CGC TAG AGA TCT GG

### 3.8 Zellkulturmedien & Zusätze

Ciprofloxacin (Ciprobay®)	Bayer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GibcoBRL, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
L-Glutamin	GibcoBRL, Eggenstein
Penicillin/Streptavidin	GibcoBRL, Eggenstein
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	GibcoBRL, Eggenstein

DMEM (voll) enthält: 10 µg/ml Ciprobay  
50 U/ml Penicillin

50 µg/ml Streptavidin  
 2 µg/ml Tetracyclin  
 10 % FCS  
 200 µM L-Glutamin

EZ Mix™ LB Agar	Sigma
Ampicillin [ad 200 µg/ml]	Sigma
Kanamycin [ad 25 µg/ml]	
	Sigma

### 3.9 Bakterien, Viren und humane Zellen

#### Bakterien

Escherichia coli DH 10 B „ElectroMax“	GibcoBRL
Escherichia coli BJ 5183	Vogelstein, Baltimore

#### Viren

Ad dl309	
Ad dl366	alle: <i>Shenk and Williams, 1984</i>

#### Virale Vektoren

Ad CMV βGal	<i>Koch et al., 2001</i>
Ad CMV F&H	Germán Horn
Ad MLP F&H	Germán Horn
Ad MLP Luc <sup>+</sup>	Germán Horn

#### Humane Zellen

H1299	Tumorzellen aus der Lunge, p53 <sup>-/-</sup>	W. Deppert, Universität Hamburg
HeLa	Tumorzellen vom Gebärmutterhals	T. Shenk, Princeton University
HER 911	Ad-transformierte Retinoblasten	Introgene, <i>Fallaux et al., 1996</i>
HEK 293 (293)	Ad-transformierte Nierenzellen	<i>Graham et al., 1977</i>
U2OS	Humane Osteosarkomzellen	T. Shenk, Princeton University

**3.10 Plasmide und Vektoren**

pAd Track CMV	<i>He et al., 1998</i>
pAd Easy1	<i>He et al., 1998</i>
pGL3-Basic	Clontech, Heidelberg
pCG F&H	Roberto Cattaneo, Mayo Clinic, Rochester, USA
pCG F&H ΔPacI	Germán Horn
pAd Track MLP	Claudia Lenz, AG Dobbelstein, Inst. für Virologie, Marburg

**3.11 Puffer**

6x DNA-Probenpuffer:	0,25 % Bromphenolblau (w/v) 40 % Sucrose (w/v) 10 % Glycerin (w/v)
EB-Puffer:	10 mM Tris (pH 8,5)
Formamid/EDTA-Probenpuffer:	Formamid, entionisiert 25 mM EDTA (pH 8,0) mit 50 mg/ml Dextranblau im Verhältnis 5:1 Formamid/EDTA+Dextranblau
6x Laemmli-Puffer:	0,35 M Tris pH 6,8 30 % Glycerin (v/v) 10 % SDS (w/v) 9,3 % Dithiothreitol (w/v) 0,015 % Bromphenolblau (w/v)
10x Laufpuffer für Proteingele:	0,1 % SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin
10x Western Salts: (pH auf 8,3 mit HCl einstellen)	0,02 % (w/v) SDS 250 mM Tris 3,2 M Glycin

Western Blot-Transpuffer:	10 % (v/v) Western Salts 10x 15% (v/v) Methanol
PBS <sup>++</sup> (Phosphate buffered saline):	236,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,1 mM MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,2 mM CaCl <sub>2</sub>
PBS <sup>deficient</sup> :	Zusammensetzung wie PBS <sup>++</sup> , jedoch ohne MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub>
RIPA-Puffer:	0,1 % Triton X-100 (v/v) 0,1 % Desoxycholat, DOC (v/v) 0,1 % SDS (w/v) 2 mM Tris/HCl pH 8,5 9 mM NaCl 1 mM EDTA 1,4 % Trasylol 18,5 % Iodacetamid
50x TAE-Puffer:	2 M Tris 1 M Natriumacetat 0,1 M EDTA
20 x SSC (pH auf 7,4 mit HCl einstellen)	150 mM NaCl (350,4 g) 15 mM Na-Citrat (176,4 g) H <sub>2</sub> O (2 L)
4 x SSC / Tween 20 / 3% BSA (Ansatzlösung)	20 ml 4 x SSC 0,2 ml Tween 20 0,6 g BSA
2 x SSC / Tween 20	100 ml 20 x SSC

(Ansatzlösung)

1,8 ml Tween 20

900 ml H<sub>2</sub>O**3.12 Geräte**

Fluoreszenzmikroskop (1)

Axiovert, Fa. Zeiss, Wetzlar

Fluoreszenzmikroskop (2)

Axiphot, Fa. Zeiss, Wetzlar

GeneQuant II

Pharmacia Biotech

ABI Prism™ 377 DNA Sequencer

Perkin Elmer

PCR-Cycler „Gene Amp PCR System 2400“

Perkin Elmer

PCR-Cycler „Primus“

MWG Biotech

PCR-Cycler „PCR Sprint“

Hybaid

Zentrifuge „Megafuge 1,0R“

Heraeus

Gene Pulser II (Elektroporation)

Bio-Rad

Western Blot-Kammer

Bio-Rad

Entwickler-Maschine „Gevamatic 60“

Agfa-Gevaert

Brutschrank „Steri-Cult 200“

Forma Scientific, Inc.

Brutschrank „Hera Cell“

Heraeus

Sterilbank

Prettl

Spektrophotometer „DU-40“

Beckman



### 3 Methoden

#### 4.1 Zellbiologische und virologische Methoden

##### 4.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte in adhärenter Zellkultur in Kunststoff-Zellkulturflaschen verschiedener Größen. Als Standard-Medium wurde DMEM verwendet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Das Passagieren der Zellen erfolgte an einer Sterilbank, um Kontaminationen zu vermeiden. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt, und die Zellen wurden mit 10 ml PBS<sup>def</sup> gewaschen, um Zelltrümmer und zweiwertige Kationen weitestgehend zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA überschichtet (ca. 30 µl/cm<sup>2</sup>) und kurz inkubiert. Durch Zugabe der gleichen Menge Medium mit FCS wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen vollständig vom Gefäßboden gelöst, ggf. mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, entsprechend verdünnt und in neuen Kulturgefäßen mit frischem Medium ausgesät.

##### 4.1.2 Präparation einer Virussuspension

Zur Präparation einer Virussuspension wurden infizierte Zellen zum geeigneten Zeitpunkt mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst. Die Zellsuspension wurde für 10 min. bei 3000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet in sterilem PBS<sup>++</sup> suspendiert. Die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (flüssiger Stickstoff/Heizblock) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 1 min. bei 14 000 rpm wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß transferiert, ggf. aliquotiert, und bei -70°C gelagert.

##### 4.1.3 Titration einer Virussuspension

Zur Bestimmung des Titers einer Virussuspension wurden am Vortag HeLa- bzw. HER-911-Zellen (bei adenoviralen Vektoren (s. 4.1.6)) auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät (4.1.1).

Zur Infektion der Zellen wurde die Virussuspension zunächst 1:100 und 1:10 000 in PBS<sup>++</sup> verdünnt. Die Zellen in den vier Kammern wurden mit je 1 µl und 10 µl der zwei Verdünnungsstufen infiziert (4.1.5). Die Objektträger wurden eine Stunde lang im Brutschrank auf dem Schwenkbrett und dann stehend inkubiert. Nach ca. 18 Stunden wurden die infizierten Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung gegen das adenovirale E2A-Protein

sichtbar gemacht und ihr Anteil an der Gesamtzellzahl (Färbung der Zellkerne mit DAPI) ermittelt. Anhand dieses Quotienten ließ sich die Konzentration der infektiösen Einheiten (infectious units, i. u.) in der untersuchten Virussuspension errechnen.

#### 4.1.4 Immunfluoreszenz

Zelluläre und virale Antigene können in ihrer intrazellulären Lokalisation durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Im Kontext dieser Arbeit wurde die Immunfluoreszenz lediglich dazu verwendet, infizierte Zellen durch Färbung gegen das virale E2A-Protein sichtbar zu machen. Dabei handelte es sich um einen indirekten Nachweis, da der proteinspezifische Erstantikörper von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Zweitantikörper erkannt wird.

Zur Färbung infizierter Zellen auf Kammer-Objektträgern wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und nach folgendem Protokoll behandelt (jeweils 300 µl/Kammer):

	Inkubationszeit
+ 4 % Paraformaldehyd (in PBS <sup>def.</sup> )	20 min.
2x mit PBS <sup>++</sup> waschen	2x kurz
+ 0,2 % Triton X100 (in PBS <sup>++</sup> )	20 min.
4x mit PBS <sup>++</sup> waschen	4x kurz
+ 10 % FCS (in PBS <sup>++</sup> )	10 min.
+ 1. Antikörper (B6-8, anti-E2A) [1:20 in 10 %FCS/PBS <sup>++</sup> ]	50 min.
3x mit PBS <sup>++</sup> waschen	2x kurz, 1x 5 min.
+ 2. Antikörper (Alexa-rot anti-mouse) [1:500 in 10 %FCS/PBS <sup>++</sup> ]	20 min.
3x mit PBS <sup>++</sup> waschen	2x kurz, 1x 5 min.
+ DAPI (1:10 000 in PBS <sup>++</sup> )	>2 min.
1x mit PBS <sup>++</sup> waschen	kurz

Die Kammern wurden vom Objektträger entfernt und die Zellen mit Fluoprep (+2,5 % DABCO) eingedeckelt.

#### 4.1.5 Infektion von Zellen mit Adenoviren

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen ausgesät, je nach Bedarf in Gewebekulturflaschen, 6-Well-Dishes, 12-Well-Dishes oder Chamber-Slides.

-Gewebekulturflaschen:	3.000.000 zur Herstellung hochtitriger Virusstocks
-6-Well-Dish:	200.000 zur Transfektion bzw. Herstellung adenoviraler Vektoren
-12-Well-Dish:	100.000 für Zytotoxizitäts-Assays, Replikations-Studie, Luziferase-Assays, Extraktion genomischer DNA, etc..

Vor der Infektion wird das Medium des zu infizierenden Gefäßes abgenommen und durch Medium ohne FCS (FCS kann die Virusabsorption behindern) ersetzt. Das Ependorff-Gefäß mit den zu infizierenden Viren wird noch einmal gut gevortext, und die Viren werden in das Gefäß überführt. Je nach gewünschter m.o.i. („multiplicity of infection“) kann die Erstellung einer Verdünnungsreihe der Viren erforderlich sein. Dieser Schritt garantiert eine höhere Infektionsgenauigkeit, sowie ein Angleichen der Volumina von Virussuspension. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren werden die Viren dann gleichmäßig mit dem Medium vermischt. Danach wird das Gefäß für 3 Stunden auf einem Kippschüttler bei 37°C geschwenkt, um eine gleichmäßige Infektion aller Zellen zu gewährleisten. Bevor das Gefäß über Nacht im Brutschrank inkubiert wird, wird noch das fehlende FCS hinzugegeben. Das Ernten der Zellen und die Probenweiterverarbeitung erfolgen je nach Experiment.

#### **4.1.6 Transduktion von Zellen mit Adenoviren**

Transduktion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen durch virale Vektoren.

Bei adenoviralen Vektoren ist die E1-Region durch eine Expressionskassette ersetzt, bestehend aus dem CMV-Promotor, dem zu exprimierenden Fremdgen und einem Polyadenylierungssignal. Das Virus ist daher bei der Replikation auf eine Komplementation der fehlenden E1-Gene angewiesen. Dazu eignen sich Adenovirus-transformierte 293- oder 911-Zellen (permissive Zellen), die die E1-Gene ins Genom integriert haben und sie konstitutiv exprimieren.

Zur Transduktion von H1299-, Hela-, und U2OS-Zellen (nicht-permissive Zellen) wurden diese, je nach Experiment, mit verschiedenen m.o.i.'s infiziert. Die im Vergleich zur Infektion erhöhte m. o. i. resultiert daraus, dass Adenoviren 911-Zellen etwa zehnmal effizienter infizieren als nicht-permissive Zellen (eigene Beobachtung). Da die Titration der Vektoren auf 911-Zellen erfolgen muss, wird die daraus bedingte Abweichung durch eine höhere m.o.i. bei der Transduktion von den anderen nicht-permissiven Zellen kompensiert.

#### 4.1.7 Transiente Transfektion mit Lipfectamin Plus

Die Zellen werden 24 Stunden vor Transfektion in 6-Well-Dishes (ca. 200.000 Zellen/Dish) ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden kurz mit PBS<sup>def</sup> gewaschen. Danach werden die Zellen erneut mit 1 ml Medium ohne FCS überschichtet. 2 µg der zu transfizierenden DNA werden in 150 µl Medium ohne FCS gelöst und 8 µl Plus-Reagenz hinzugegeben. Es folgt eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann werden 5 µl Lipofectamin mit 150 µl Medium ohne FCS vermischt und diese Suspension dem DNA-Gemisch zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit wird diese Probe auf die Zellen gegeben und diese weitere 3 Stunden bei 37°C auf einem Kippschüttler inkubiert. Sollten die Zellen schon nach 2 Stunden morphologisch stark angegriffen sein, kann die Inkubationszeit auch verkürzt werden. Nun werden 1,5 ml Medium und 150 µl FCS hinzugegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank belassen.

#### 4.1.8 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (*FISH*)

Die Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung ist eine Gen-Detektionsmethode, bei der die Zell- bzw. Chromosom-Lokalisation einer spezifischen DNA-Sequenz bestimmt wird. Das Ziel besteht darin, die Sequenzen eines bestimmten Gens (zelluläres bzw. virales) durch die Verwendung markierter DNA-Sonden sichtbar zu machen. Diese Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Lokalisation des adenoviralen Genoms in einem Synzytium zu bestimmen. Zur Durchführung einer FISH-Analyse werden infizierte Zellen und biotinylierte DNA-Sonden benötigt.

##### *Vorbereitung der Zellen für FISH:*

Am Vortag der Infektion wurden Zellen auf Kammer-Objektträgern (\*) ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

(\*) Die Kammer-Objektträger für dieses Experiment bestehen aus einem Super Frost/Plus®-Objektträger als anhaftende Oberfläche für die Zellen und Parafilm® als Kammer-Wände für die Mediumflüssigkeit. So werden die Kanten des Objektträgers mit Parafilm®-Wänden abgedichtet. Da diese Kammer-Objektträger keinen Deckel haben, wurden sie in Petrischalen gesetzt und zugedeckt. Eine Alternative besteht in der Verwendung der schon vorbereiteten

Kammer-Objektträger (Glas) der Firma Nunc (Lab-Tek™ II- Chamber Slide™ System; Nunc „Life Technologies“).

Die Zellen wurden mit Adenoviren bzw. adenoviralen Vektoren je nach Experiment infiziert. Zur Vorbereitung infizierter Zellen auf Kammer-Objektträgern für FISH wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS<sup>++</sup> 3 x gewaschen und nach folgendem Protokoll behandelt:

Arbeitsschritt	Lösung	Inkubationszeit	Temperatur
Fixierung	+ 4 % Paraformaldehyd (in PBS <sup>def</sup> )	20 min.	RT
Entfernung des Fixierers	3 x mit PBS <sup>++</sup> waschen	Je 2 min.	RT
Permeabilisierung	+ 0,5 % Triton X100 (in PBS <sup>++</sup> )	20 min.	RT
Entfernung des Permeabilisierers	4 x mit PBS <sup>++</sup> waschen	Je 2 min.	RT
Equilibrierung	3 x mit 2 x SSC waschen	Je 5 min.	RT
Lagerung	<i>Die Objektträger können hier in 2 x SSC gelagert werden</i>	<i>Nicht länger als 3 Tage</i>	4°C
Rehydrierung der Objektträger	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 % Ethanol</li> <li>• 70 % Ethanol</li> <li>• 50 % Ethanol</li> <li>• 30 % Ethanol</li> </ul>	Je 2 min	RT
Equilibrierung	0,1 x SSC	2 min	RT
Equilibrierung	2 x SSC	2 min	RT
Verbesserung der Genomstruktur	2 x SSC	5 min	75°C
Abkühlen der Objektträger in der Küvette		20-30 min.	RT
Equilibrierung	0,1 x SSC	1 min.	RT
Denaturierung der DNA	0,07 N NaOH	1 min.	RT
Equilibrierung	0,1 x SSC	1 min.	4°C
Equilibrierung	2 x SSC	1 min.	4°C
Dehydrierung der Objektträger	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30% Ethanol</li> <li>• 50% Ethanol</li> <li>• 70 % Ethanol</li> <li>• 100 % Ethanol</li> </ul>	Je 2 min.	RT
Lufttrocknen der Objektträger		10-15 min.	RT

Die Objektträger sind jetzt fertig für die Hybridisierung mit den DNA-Sonden.

***Vorbereitung der adenoviralen DNA-Sonden für FISH (Nick Translation):***

Zur Herstellung sensitiver Sonden für die In-situ-Hybridisierung wurde der Biotin-Nick Translation Mix® von Roche verwendet. Dieses System ermöglicht die Herstellung von biotinylierten DNA-Sonden durch die Anwendung der Nick-Translation.

Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass *E.coli*-DNase I bei sehr niedriger Enzymkonzentration in Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub> an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrats Einzelstrangsnitte, sogenannte „nicks“ erzeugt.

*E.coli*-DNA-Polymerase I benutzt die 3'-OH-Enden dieser „nicks“ als Primer für die 5'→3' DNA-Synthese, komplementär zum intakten Strang. Die 5'→3' Exonuclease Aktivität der DNA Polymerase I entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in Syntheserichtung. Die durch die Exonuclease-Aktivität abgebauten Nukleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit Biotin-markierten Nukleotiden ersetzt. Bei niedrigerer Raumtemperatur (15°C) wird so unmarkierte DNA durch neu synthetisierte markierte DNA ersetzt. So entstehen bei der Nick-Translations-Reaktion Fragmente verschiedener Größen. Die durchschnittliche Länge dieser Fragmente ist von der Reaktionszeit abhängig und dies kann die Effizienz der Hybridisierung stark beeinflussen. Die Verwendung von Sonden mit durchschnittlicher Fragmentgröße über dem optimalen Bereich von 200-500 Nukleotiden resultiert meist in fleckigen Hintergrundsignalen, die durch unspezifische Anheftung der Probe an die Glasoberfläche entstehen.

In dem Biotin-Nick Translation Mix® wurde das Biotin-16-dUTP-Nukleotid mit anderen nicht-biotinylierten Nukleotiden (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) zusammen angesetzt. Das molare Verhältnis von Biotin-16-dUTP zu dTTP ist so eingestellt, dass alle 20-25 Nukleotide in der neu synthetisierten DNA mit Biotin modifiziert sind. Die *E.coli*-DNase I, -DNA-Polymerase I, Reaktionspuffer und die genannten Nukleotide wurden in einem einzigen Mix-Ansatz des Kits zusammengestellt.

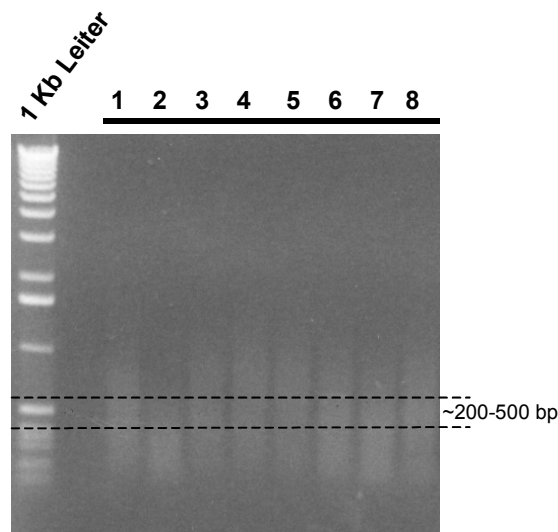
Zur Herstellung adenoviraler DNA-Sonden wurde das adenovirale Plasmid *pAd Easy 1* als Templat (Substrat) für die Nick-Translation verwendet. Dieses Plasmid enthält das gesamte adenovirale Genom mit Deletionen in der E1 und E3 Regionen der Adenoviren.

Die adenoviralen DNA-Sonden wurden durch biotinylierende Nick-Translation wie folgt hergestellt:

(Nur für ein Aliquot bzw. einen Hybridisierungsansatz)

Schritt	Aktion
1	1µg pAd Easy 1 wird mit sterilem doppelt. dest. Wasser auf ein Volumen von 16µl gebracht
2	4µl Biotin-Nick Translation Mix® dazugeben, vortexen, und kurz abzentrifugieren
3	90 min. bei 15°C inkubieren
4	Den Reaktionsansatz auf Eis stellen 3µl des Reaktionsansatzes entnehmen, mit Gel-Ladepuffer versetzen und auf einem Agarosegel mit DNA-Längenstandard auftrennen Die optimale Größe der meisten Fragmente sollte zwischen 200 und 500 Nukleotiden liegen (Abbildung 4.1)
5	Wenn nötig, wird der Reaktionsansatz bei 15°C weiter inkubiert und die Größen-Verteilung der markierten Fragmente erneut überprüft
6	Wenn die optimale Fragmentgröße erreicht ist, die Reaktion mit 1µl 0,5M EDTA (pH 8,0) pro 20µl Reaktionsvolumen und durch Erhitzen bei 65°C für 10 min stoppen
7	83µl H <sub>2</sub> O dazugeben und eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit darauffolgender Ethanol-fällung durchführen
8	Das getrocknete Pellet wird in 12,5 µl Formamid (deionisiert, pH 7.0) aufgenommen und auf einem Eppendorf-Schüttler (1 Stunde bei 37°C) gelöst
9	Zugabe von 12,5µl Hybridisierungsmix (2,5 µl 20 x SSC, 5µl 10% Dextransulfat und 5µl H <sub>2</sub> O) mischen und abzentrifugieren
10	Denaturierung der DNA-Sonde (15 min, 75°C), dann 5 min. auf Eis abkühlen Endvolumen des Sonden-Aliquots: 25 µl

Die DNA-Sonden sind jetzt fertig für die Hybridisierung mit den für FISH vorbereiteten Objektträgern.



**Abb. 4.1: Vorbereitung der biotinylierten Sonden für die Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH).**

Zur Vorbereitung der Sonden wurde die Nick-Translations-Methode verwendet. Als Templat wurde jeweils 1 µg des adenoviralen Plasmids pAdEasy1 in acht verschiedenen Translationsansätze eingesetzt und dann zwei Stunden bei 15°C inkubiert. Am Ende dieser Reaktion wurde von jedem Ansatz jeweils 3 µl Translationsprodukt auf einem 0,8% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, mit dem Ziel, die Länge der biotinylierten Amplifikate (Sonden) festzustellen. Auf dem Bild lassen sich die typischen „DNA-Schmierbanden“ (**1 bis 8**) erkennen, in welchen der stärkste Intensitätsbereich zwischen 200- und 500 bp liegt. Dieser erkennbare Intensitätsbereich korreliert mit den am meisten synthetisierten Fragmenten, die in diesem Fall und auf Grund ihre Länge für eine optimale Hybridisierung geeignet sind.

### **Hybridisierung:**

Die Hybridisierung erfolgt auf einer 37°C Heizplatte mit dem Auftragen von 25 µl vorbereiteter DNA-Sonde auf einem luft-getrockneten Objektträger. Der Sonden-Spot wird blasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt, mit Fixogum® abgedichtet und 30 Minuten auf der Platte getrocknet. Dann werden die versiegelten Objektträger in einer feuchten Kammer im 37°C Brutschrank über Nacht behalten.

### **Waschen nach der Hybridisierung und anschließende Detektion der Sonden:**

Der polymerisierte Fixogum®-Rand wird mit einer Pinzette abgezogen und wie folgt weiter behandelt:

Arbeitsschritt <i>Lichtgeschützt arbeiten!</i>	Lösung	Inkubationszeit	Temperatur
Ablösen des Deckglases	2 x SSC	5 min.	RT
Waschung	2 x SSC/Tween	5 min.	RT
Stringente Waschung	1 x SSC	5 min.	37°C
Blocken	4 x SSC/ Tween / 3% BSA	5 min.	RT



Fluorochrom-Markierung für Biotin-markierten Sonden	Avidin- Texas Red (1 ml 4 x SSC/Tween + 2µl Avidin-Texas Red)	60 min.	37°C <i>in feuchter Kammer!</i>
Waschung	2 x SSC/Tween	2 x 5 min.	37°C
Kernfärbung <i>DAPI-Färbung</i>	DAPI-Lösung	5 min.	RT
Lufttrocknen der Objektträger		5 min.	RT
Abdecken mit geeigneten Deckgläsern	Vectaschield® („Antifading“)	1 Stunde	RT
Lagerung <i>Lichtgeschützt!</i>			4°C

Die Präparate sind fertig für die mikroskopische Untersuchung unter Anregung der Fluoreszenz.

#### 4.1.9 Kultivierung und Selektion von Bakterien

Die Kultivierung der zur Transformation (4.2.15, 4.2.16) verwendeten Bakterien (E. coli, DH 10 B bzw. BJ 5183-AdEasy-1) erfolgte entweder in Flüssigkultur oder auf Agar-Platten aus LB-Medium. Die Selektion von Bakterien mit den gewünschten Plasmid-Klonen erfolgte durch Zugabe von Ampicillin [ad 200 µg/ml] oder Kanamycin [ad 25 µg/ml] zum Kulturmedium.

#### 4.1.10 Inhibierung der Masernvirusprotein-F<sub>1</sub> induzierten Fusion durch FIP (Fusionsinhibierendes Peptid) (*Richardson et al., 1980*)

Zur Inhibierung der Fusionsaktivität durch Masernvirusprotein-F wurde das fusionsinhibierende Peptid FIP verwendet.

Das FIP-Peptid (Z-D-Phe-L-Phe-Gly) interferiert kompetitionsweise mit der N-Terminal-Region des Masernvirus Protein F<sub>1</sub>. Auf diese Art wird der hydrophobe Bereich dieses Proteins neutralisiert und die entsprechende Fusion inhibiert (*Richardson und Choppin, 1983*). Das Peptid ist erhältlich bei der Firma Sigma oder Bachem und wird in lyophilisierter Form geliefert und ist nur in Ethanol löslich. So sind 5 mg dieses lyophilisierten Peptides in 1 ml absolutem Ethanol löslich und wird erst dadurch gebrauchsfertig. Diese FIP-Lösung wird für Experimente weiter verwendet. Zur absoluten Inhibierung der Fusionsaktivität wurden

FIP-Endkonzentrationen von 100µg im Zellkulturmedium verwendet. Dadurch enthalten die mit FIP versetzten Zellmedien auch eine Endkonzentration von 1,7 mM Ethanol. Aufgrund dessen werden zur Kontrolle Zellansätze mit DMEM-FCS-Ethanol 1,7 mM behandelt, damit die Bedingungen der Experimente vergleichbar sind.

## 4.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration von Lösungen erfolgte im Photometer [Gene Quant II, Pharmacia Biotech] durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung von Quarzküvetten. Bei dieser Wellenlänge sind Absorption und Nukleinsäurekonzentration der Lösung im linearen Bereich der Absorptionskurve direkt proportional. Die Lösung wurde mit dH<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Konzentration berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration} = \text{Abs}_{260} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnung}$$

Dabei gelten folgende Faktoren:

dsDNA: 50 µg/ml  
ss DNA und RNA: 40 µg/ml  
ss Oligonukleotide: 20 µg/ml

Zur Bestimmung der Reinheit der untersuchten Lösung dient der Quotient aus  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ . Saubere Nukleinsäurelösungen zeigen einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0. Kontaminationen mit Proteinen ergeben niedrigere, solche mit Phenol höhere Werte.

### 4.2.2 Ethanolfällung

DNA wurde aus wässriger Lösung mittels Ethanolfällung präzipitiert. Dem Ansatz wurde Glykogen hinzugefügt, um das Pellet besser sichtbar zu machen.

Ansatz:

1 Vol.	DNA-Lösung
1 µl	Glycogen [20 µg/µl]
0,1 Vol.	3 M Natriumacetatlösung, pH 5,2
2,5 Vol.	100 % Ethanol (4°C)

Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 15 min. bei 14 000 rpm und 4°C pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und anschließend in einem geeigneten Puffer gelöst.

#### **4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

DNA und RNA wurden unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Der Größe der aufzutrennenden Moleküle entsprechend wurden 0,8 - 2 %ige Gele verwendet.

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gelöst, nach dem Aufkochen mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in Gelschlitten für Horizontalgele gegossen. Dabei wurden 8 - 12zählige Kämme verwendet. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 80 - 130 V und maximaler Stromstärke. Anschließend wurde die Nukleinsäure auf einem UV-Schirm betrachtet und das Ergebnis durch ein Polaroid-Foto dokumentiert.

#### **4.2.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen**

Die DNA wurde im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Schirm betrachtet und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei muss langwelliges UV-Licht (304 nm) verwendet werden, um Schädigungen der DNA durch die UV-Bestrahlung zu vermeiden. Der Agarose-Block wurde in ein kleines Eppendorf-Gefäß (0,5 ml) transferiert, welches zuvor am Boden mit einer Kanüle durchstoßen worden war. Dieses wurde in ein großes Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gestellt. Bei der anschließenden Zentrifugation wurde die Agarose beim Durchtritt durch das kleine Loch zerkleinert und im großen Gefäß aufgefangen. Nun wurden 2 Volumen Phenol zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 min. lang auf dem Vortex-Gerät gut gemischt und dann sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 30 min. bei 14 000 rpm und 4°C. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und einer Phenol/Chloroform-Extraktion (4.2.5) mit anschließender Ethanol-Fällung (4.2.2) unterzogen.

#### 4.2.5 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen. Dabei wurde die Lösung zunächst mit einem Volumen Phenol (pH 8,0) und dann mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1, v/v) ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert und die obere, wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäß überführt. Die Proteine werden dadurch denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase oder der Interphase. Die in der gereinigten Lösung verbliebenen Nukleinsäuren wurden anschließend in einer Ethanol-fällung (4.2.2) präzipitiert.

#### 4.2.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte unter Verwendung des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer), einer PCR-Maschine und des ABI Prism™ 377 DNA-Sequencers.

Das Reaktionsprinzip entspricht der von Sanger und Coulson entwickelten PCR-Kettenabbruchmethode (*Sanger and Coulson, 1975*). Jedoch sind im Unterschied zur ursprünglichen Methode die vier Didesoxynukleotidklassen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Sequenzierreaktion kann so in einem Ansatz erfolgen, da der Sequencer nach elektrophoretischer Auftrennung der Probe und Anregung der Farbstoffe durch einen Laser die spezifischen Fluoreszenzstrahlungen durch eine Kamera digitalisiert. Die unterschiedlichen Signale werden an einen Computer weitergeleitet und mit der mitgelieferten Software ausgewertet.

Reaktionsansatz:	4 - 8 µl	Terminator-Mix
	50 ng	Sequenzier-Primer
	1 µg	DNA-Templat
	ad 20 µl	dH <sub>2</sub> O

Temperaturzyklen:	96°C	2 min.
	96°C	10 s
25x	50°C	5 s
	60°C	4 min.
	4°C	Reaktionsende, Lagerung

Nach Programmende wurde die DNA der Probe mit Ethanol gefällt (4.2.2). Das Pellet wurde in 4 µl Formamid/EDTA-Probenpuffer gelöst. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 95°C wurden 2 µl zur Beladung des Sequenziergels eingesetzt.

Sequenziergel (5 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff):

Ansatz:                21 g Harnstoff  
                          8,4 ml 30 %ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)  
                          6,0 ml 10x TBE, pH 8,0  
                          20,0 ml dH<sub>2</sub>O

Die Lösung wurde so lange gerührt, bis die Harnstoffkristalle vollständig gelöst waren, über eine Membran (Porengröße 0,2 µm) gefiltert und 5 Minuten entgast. Die Gelapparatur muss gründlich mit Alconox, dH<sub>2</sub>O und 90 % Isopropanol gereinigt werden. Durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) zur Acrylamid-Lösung wurde die Polymerisation gestartet.

350 µl 10 % (w/v) APS  
20 µl TEMED

Die Auftrennung der Proben erfolgte in TBE (pH 8,0) bei 48 W und dauerte ca. 10 Stunden.

#### **4.2.7 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen**

Die Isolierung zellulärer wie viraler DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp Kits bzw. DNAeasy Mini Kits von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

#### **4.2.8 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)**

Die PCR dient der spezifischen Amplifizierung von DNA-Sequenzen zwischen zwei Oligonukleotid-Fragmenten (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden (*Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985*).

Die Matrizen-DNA („template“) wird zunächst durch hohe Temperatur (>90°C) in ihre Einzelstränge getrennt. Danach erfolgt bei geeigneter Temperatur die Anlagerung („annealing“) der Primer, woraufhin diese durch die eingesetzte DNA-Polymerase verlängert

werden („elongation“). Als Matrize dient der an den Primer gebundene Komplementärstrang. Diese Reaktionssequenz wird zyklisch mehrere Male wiederholt. Die jeweils synthetisierten DNA-Stränge können in der darauffolgenden Runde ihrerseits als Matrize dienen, so dass eine exponentielle Amplifizierung der DNA-Menge erfolgt.

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA wurde das Expand HIFI Polymerase System (Roche) verwendet. Der enthaltene Polymerase-Mix amplifiziert auch große Abschnitte (> 1kb) mit relativ geringer Fehlerrate.

PCR-Ansatz:

- 5,0 µl 10x Puffer
- 0,5 µl dNTP-Mix [je 20mM]
- 1,0 µl Vorwärts-Primer [50 ng/µl]
- 1,0 µl Rückwärts-Primer [50 ng/µl]
- 200 ng DNA-template
- 1,0 µl EHF Enzym-Mix [3,5U/µl]
- ad 50 µl dH<sub>2</sub>O

Die PCR erfolgte in programmierbaren PCR-Maschinen in speziellen, dünnwandigen PCR-Gefäßen.

PCR-Programm:	94°C	3 min.	Denaturierung
	94°C	30 s	Denaturierung
40x	55°C	30 s	„Annealing“
	70°C	2,5 min.	Elongation
	70°C	7 min.	Elongation
	4°C	∞	Reaktionsende, Lagerung

#### 4.2.9 Amplifikation von großen DNA-Fragmenten ( Expand Long Template PCR System® )

Zur Amplifikation großer DNA-Fragmente (von 1 kb bis 20 kb) wurde das *Expand Long Template PCR System*® von Roche verwendet. Dieses Amplifikations-Kit besteht aus einem einzigen PCR-Amplifikationsansatz, der die Taq-Polymerase in Kombination mit einer korrektionsfähigen Polymerase ( proofreading polymerase) enthält. Die Amplifizierung großer Fragmente verlangt die Anwendung von Amplifikationsansätzen, deren Polymerasen

eine dauernde Elongation durchhalten können. Mit der Verwendung dieses Systems ist die Synthese großer DNA-Abschnitte (<20 kb) möglich.

PCR-Ansatz 1:

„Mix I“                      1,75 µl dNTP-Mix [je 20mM]  
                                     6,0 µl Vorwärts-Primer [50 ng/µl]  
                                     6,0 µl Rückwärts-Primer [50 ng/µl]  
                                     10 ng DNA-template

ad 50 µl dH<sub>2</sub>O (32,5 µl)

PCR-Ansatz 2:

„Mix II“                      10 µl 10x Puffer 1  
                                     1,5 µl Exp. Long. Template Polymerase  
                                     6,0 µl Rückwärts-Primer [50 ng/µl]

ad 50 µl dH<sub>2</sub>O (38,5 µl )

Ansatz 1 und 2 werden zusammenpipettiert und gevortext.

PCR-Programm:	94°C	2 min.	Denaturierung
	94°C	10 s	Denaturierung
10x	65°C	30 s	„Annealing“
	68°C	4 min.	Elongation (für 6 kb)
	<b>94°C</b>	10 s	Denaturierung
<b>15x</b>	<b>65°C</b>	30 s	„Annealing“
	<b>68°C</b>	6 min + 12 s x Zyklus	Elongation (für 6 kb)
	68°C	7 min	Elongation
	4°C	∞	Reaktionsende, Lagerung



#### **4.2.10 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)**

Zur Plasmidpräparation wird das QIAprep-Spin-Miniprep-Kit der Firma Quiagen verwendet. Puffer, Säulen und Auffanggefäße sind Bestandteil des Kits.

Zunächst werden 4 ml 2YT- oder LB-Medium mit Antibiotikum (200µg/ml) versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Die Bakterien werden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur werden in einem Eppendorfcup bei 14 000 rpm 1 Minute abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 250µl Puffer 1 resuspendiert, mit 250µl Puffer 2 für 5 Minuten lysiert und mit 350µl Puffer 3 neutralisiert. Zur Trennung der DNA/ Bakterienwände wird das Lysat bei 4°C und 14 000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine Säule pipettiert und 1 Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert, um die Plasmid-DNA an die Säule zu binden. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 750µl PE-Puffer (Zentrifugation wie oben) gewaschen. Anschließend ist noch eine weitere Zentrifugation erforderlich, um Pufferreste zu entfernen. Zur Elution der DNA tauscht man das Auffanggefäß gegen ein Eppendorfcup aus, pipettiert 50µl EB-Puffer auf die Säule und zentrifugiert erneut.

#### **4.2.11 Plasmid-Präparation im großen Maßstab (Maxi-Präparation)**

Zur Maxi-Präparation wird das Maxiprep-Kit der Firma Quiagen verwendet. Puffer, Säulen und Auffanggefäße sind Bestandteil des Kits. Zunächst ist es erforderlich, 250 ml 2YT- oder LB-Medium mit Antibiotikum und einer Bakterienkolonie anzuimpfen und die Kultur über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler zu inkubieren. Diese Übernachtskultur wird in einem 250 ml Zentrifugegefäß mit Rotor JA-7,5 oder JA-10 bei 6 000 rpm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. 900 µl dieser Übernachtskultur werden mit 150 µl Glycerol (80%) versetzt und in einem Eppendorfcup bei -70°C als Glycerolkultur aufbewahrt. Von dieser Glycerolkultur können direkt Maxi- oder Mini-Präparationen angeimpft werden. Das Bakterienpellet wird mit 10 ml Puffer 1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer 2 für 5 Minuten lysiert und mit 10 ml Puffer 3 neutralisiert. Anschließend gibt man die Bakterienkultur auf einem Maxiprep-Filter und inkubiert die Suspension 10 Minuten lang. Während dieser Inkubationszeit äquilibriert man die Maxi-Prep Säulen mit 10 ml QBT-Puffer. Die Bakteriensuspension wird dann durch den Filter gepresst und ist nun frei von Zellwandfragmenten und Proteinen und kann direkt auf die Säule gegeben werden. Nach Durchfluss des Bakterienlysates wird die Säule 2x mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt mit 15 ml QF-Puffer. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wird die DNA gefällt. Das Pelletieren der DNA geschieht durch Zentrifugation bei 15 000 rpm bei 4°C für 40 Minuten. Der Überstand wird verworfen und

das DNA-Pellet wird mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation bei 15 000 rpm für 15 Minuten wird das DNA-Pellet getrocknet und in 500-1000 µl EB – Puffer resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch.

#### 4.2.12 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen ist eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung oder Modifizierung von Plasmiden während der Herstellung neuer Vektoren.

Ein analytischer Ansatz dient der schnellen Überprüfung von Plasmiden. Der komplette Ansatz kann nach Inkubation und Zugabe von 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) direkt im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt werden.

Der präparative Ansatz dient der Herstellung geeigneter Fragmente bei der Einführung neuer DNA-Abschnitte in Vektoren. Unter Umständen muss die DNA nach der Inkubation im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus der Agarose extrahiert werden (4.2.4).

Analytischer Ansatz:	7 µl	Plasmid-DNA aus MiniPrep ( $\cong$ 1-2 µg DNA)
	(1 µl	BSA (bovine serum albumine))
	1 µl	10x Puffer
	1 µl	Restriktionsendonuklease(n)
	ad 10 µl	dH <sub>2</sub> O

Präparativer Ansatz:	10 µg	Plasmid-DNA
	(10 µl	BSA)
	10 µl	10x Puffer
	10 µl	Restriktionsendonuklease(n)
	ad 100 µl	dH <sub>2</sub> O

Die Restriktionsendonukleasen werden vom Hersteller mit geeignetem 10x Puffer und ggf. mit BSA geliefert, welches der Stabilisierung der Enzyme dient. Die Kombination verschiedener Enzyme ist i. A. möglich. Dabei verweist der Hersteller auf Tabellen, aus welchen die geeigneten Bedingungen zu entnehmen sind. Besitzen zwei Enzyme verschiedene Temperaturoptima, muss die Behandlung der DNA mit ihnen sequenziell erfolgen.

#### 4.2.13 Auffüllung nicht kompatibler, überhängender Enden

Ist es aus technischen Gründen nicht möglich, zwei zu verbindende DNA-Moleküle so mit Restriktionsendonukleasen zu behandeln, dass kompatible, überhängende Enden entstehen, kann man die einzelsträngigen Enden mit Nukleotiden auffüllen und die stumpfen Enden (blunt ends) miteinander ligieren.

Ansatz:        44 µl    gereinigte DNA in EB-Puffer  
                              (nach Phenol/Chloroform-Extraktion (4.2.5))  
              5 µl    10x Pfu-Puffer  
              1 µl    dNTP-Mix [je 20 mM]  
              1 µl    Pfu-Polymerase [2,5 U/µl]

Inkubation 30 min. bei 70°C.

#### 4.2.14 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Vermeidung einer Religation oder Oligomerisierung von Vektoren, die nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen kompatible Enden besitzen, werden die 5'-Enden der linearisierten Plasmide durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase, CIP) dephosphoryliert. Dazu wurden dem Restriktionsansatz nach 1 Stunde Inkubation 2 µl CIP (20 U/µl) zugesetzt.

Der Ansatz wurde für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert und dann analog zur restriktionsverdauten Insert-DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinbestandteilen befreit.

#### 4.2.15 Ligation

DNA-Ligasen verknüpfen freie 5'-Phosphatgruppen und 3'-OH-Gruppen von DNA-Molekülen durch Bildung einer Phosphodiesterbindung unter Verbrauch von ATP. Auf diese Weise kann z. B. ein zusätzlicher DNA-Abschnitt in einen vorhandenen Vektor eingebracht werden. Dabei ist es vorteilhaft, das molare Verhältnis der verschiedenen DNA-Moleküle zugunsten des Inserts zu verschieben.

Ansatz:        3 µl    Insert-DNA (ca. 1,5 µg)  
              0,5 µl    Vektor-DNA (ca. 0,3 µg)

0,5 µl	ATP [100µM]
0,5 µl	T4-DNA-Ligase [30 Weiss units/µl]
0,5 µl	10x Ligationspuffer
0,5 µl	dH <sub>2</sub> O

Um nachträglich beim Auszählen der erhaltenen Kolonien das Verhältnis von religierten Vektoren zu ligierten Plasmiden abschätzen zu können, wurde parallel ein Kontrollansatz mitgeführt, in dem lediglich die Insert-DNA durch dH<sub>2</sub>O ersetzt war. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **4.2.16 Chemische Transformation**

Die Einbringung von DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Zwei gängige Methoden sind die chemische Transformation und die Elektroporation (4.2.17). In beiden Fällen sind speziell kompetente Bakterien notwendig, deren Zellwand unter bestimmten Umständen für DNA durchlässig wird.

Die Plasmid-DNA (1 ng ist schon ausreichend) wurde mit 25 µl chemisch kompetenten Bakterien gemischt. Das Gemisch wurde 15 Minuten auf Eis vorinkubiert, dann einem Hitzeschock von 45 s bei 42°C unterzogen, auf Eis abgekühlt und auf entsprechend selektiven Agarplatten ausplattiert (4.1.9).

##### ***Herstellung chemisch kompetenter Bakterien:***

250 ml LB-Medium wurde mit 1 ml einer Übernachtskultur DH 10 B Bakterien angeimpft. Sobald die Kultur eine OD<sub>590</sub> von 0,5 erreicht hatte, wurde sie 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 5 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 62,5 ml steriler, kalter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gestellt und für 5 Minuten bei 300 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in steriler, kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und mit 5 ml Glycerin (80 %) versetzt. Die Bakterien wurden aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

#### **4.2.17 Elektroporation**

7 µl elektrokompetente DH 10 B-Bakterien wurden mit 0,3 µl DNA (nach Ethanolfällung) gemischt und kurz auf Eis vorgekühlt. Der Ansatz wurde in eine ebenfalls vorgekühlte Elektroporationskuvette transferiert. Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser Controller bei 1,7 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach erfolgreicher Durchführung (Zeitkonstante >4,5 ms)

wurden 100 µl LB-Medium zugesetzt und die Bakteriensuspension anschließend auf entsprechend selektiven Agarplatten ausplattiert (4.1.9).

#### **4.2.18 Isolierung von RNA mit Trizol**

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wird das Medium über den Zellen abgenommen und die Zellen kurz mit PBS<sup>def</sup> gespült. Danach werden die Zellen mit Trizol überschichtet. Wie bei allen Arbeiten mit RNA ist das Tragen von Handschuhen sehr wichtig.

##### Mengen an Trizol:

6-Well-Dish	1 ml
kleine Kulturflasche	3 ml
große Kulturflasche	6 ml

Die Zellen werden für 5-10 min. inkubiert. Danach wird mit einer Pipette das Trizol mehrmals auf und abpipettiert. Es werden nun Eppendorf-Gefäße mit je 1 ml Trizol-Zell-Gemisch gefüllt. In das Eppendorf-Gefäß werden nun 200µl Chloroform zugegeben und das Gemisch wird 15 Sekunden gevortext. Nach 3 minütiger Lagerung bei Raumtemperatur wird das Gemisch 15 Minuten bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es bilden sich 2 Phasen, wobei die RNA in der oberen, wässrigen Phase gelöst ist. Diese wird abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es werden dann 500 µl Isopropanol hinzugegeben und das Eppendorf-Gefäß wird 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die RNA fällt in dieser Zeit aus und wird anschließend pelletiert, indem das Eppendorf-Gefäß 15 Minuten mit 12 000 rpm bei 4°C zentrifugiert wird. Danach wird der Überstand verworfen und die RNA mit 80 prozentigem Ethanol kurz gewaschen. Die getrocknete RNA wird dann in RNase-freiem Wasser oder EB-Puffer aufgenommen. Die Menge sollte so gewählt werden, dass Konzentrationen von 1-2 µg/µl entstehen.

#### **4.2.19 DNase Behandlung**

Die RNA kann zusätzlich mit DNase behandelt werden, um eine besonders reine, von genomischen Rückständen befreite RNA zu erhalten. Hierzu werden 500 µl RNA (Konzentration ca. 1 mg/ml) mit 100 µl 10 x DNase I Puffer, 50µl DNase I und 350µl Wasser

versetzt. Nach kurzem Mixen wird das Gemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert, und die Reaktion wird mit 100µl Terminations-Mix gestoppt.

Das Gemisch wird nun auf zwei Eppendorf-Gefäße zu je 550 µl verteilt und es werden 500µl Phenol und 300µl Chloroform hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen werden die beiden Phasen durch 10 minütige Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4°C getrennt und die obere Phase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. In einem zweiten Reinigungsschritt werden nun 550µl Chloroform hinzugegeben, das Gemisch gevortext und erneut bei 14 000 rpm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Die obere Schicht wird erneut vorsichtig abgetrennt und es werden 50µl 2M NaOAc und 1,5 ml Ethanol (95%) hinzugegeben (optional noch 20 µg Glycogen). Das Gemisch wird 10 Minuten auf Eis und 15 Minuten bei 14 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig mit Ethanol (80%) gespült. Nach dem Trocken wird die RNA in ca. 200µl RNase freies Wasser oder EB-Puffer aufgenommen und bei -70°C gelagert.

#### 4.2.20 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA übersetzt. Die reverse Transkription der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des Superscript™ II RT-Kits.

Abweichend zum Handbuch wurde folgender Ansatz verwendet:

RT-Ansatz:            5 µg    RNA  
                          1 µl    RT-Primer  
                          ad 12 µl   dH<sub>2</sub>O  
Inkubation für 10 min. bei 70°C  
                          4 µl    1<sup>st</sup> strand buffer  
                          2 µl    0,1M DTT  
                          1 µl    10mM dNTP-Mix  
Inkubation für 2 min. bei 42°C  
                          1 µl    Superscript II  
Inkubation für 50 min. bei 42°C  
Inkubation für 15 min. bei 70°C

#### 4.2.21 Semi-quantitative RT-PCR

Als RT-PCR bezeichnet man die Amplifizierung der aus der Reversen Transkription (4.2.20) erhaltenen cDNA. Das Reaktionsprinzip unterscheidet sich nicht von dem der normalen PCR (4.2.8).

Die RT-PCR wurde hier dazu verwendet, Rückschlüsse auf die Menge der vor der Reversen Transkription vorhandenen RNA zu ziehen. Dabei geht man davon aus, dass die vorhergehende Reverse Transkription der verschiedenen RNA-Proben in allen Fällen gleich effizient war.

Jeder Reaktionsansatz der RT-PCR wurde auf mehrere PCR-Gefäße verteilt (je 20 µl). Die Aliquots wurden in der selben PCR-Maschine inkubiert, aber nach einer unterschiedlichen Zahl von Zyklen auf Eis gestellt. Da sich die DNA in der PCR im Idealfall in jedem Zyklus in Abhängigkeit von der Zahl der Templatmoleküle vermehrt, ließ sich bei anschließender Betrachtung verschiedener Proben desselben Zyklus im Agarose-Gel (4.2.3) durch Vergleich der Bandenstärken eine Aussage über die ursprüngliche Templatmenge machen. Diese Art der Bestimmung von mRNA-Mengen ist semi-quantitativ, da sie nur eine relative Aussage zulässt.

PCR-Ansatz:	10 µl	10x Reaktionspuffer
	2 µl	dNTP-Mix [je 20 mM]
	14 µl	Vorwärts-Primer [50 ng/µl]
	14 µl	Rückwärts-Primer [50 ng/µl]
	0,75 µl	EHF Enzym-Mix [3,5 U/µl]
	ad 98µl	dH <sub>2</sub> O

mischen,

2 µl cDNA hinzufügen,

mischen,

auf bis zu 4 Gefäße (je 20 µl) verteilen.

PCR-Programm:	95°C	3 min.	Denaturierung
	95°C	30 s	Denaturierung
X Zyklen	55°C	30 s	„Annealing“
	70°C	2,5 min.	Elongation

4°C      ∞      Reaktionsende, Lagerung

#### 4.2.22      **Luziferase-Test**

Dieser Test wird zur Untersuchung von Promotoren in der Zelle verwendet. Dazu kloniert man den gewünschten Promotor in ein Reporter-Plasmid vor ein Luziferase-Gen. Das Plasmid wird in Zellen transfiziert, welche unterschiedlichen Bedingungen unterzogen werden können. Nach einer variablen Inkubationszeit werden die Zellen geerntet und lysiert. Mittels Enzymtest kann nun nach Abgleich der Gesamtproteinmenge die spezifische Luziferase-Aktivität der Probe bestimmt werden. Diese gibt Aufschluss über die Transkriptionsrate des Luziferase-Gens, das unter Kontrolle des klonierten Promotors stand.

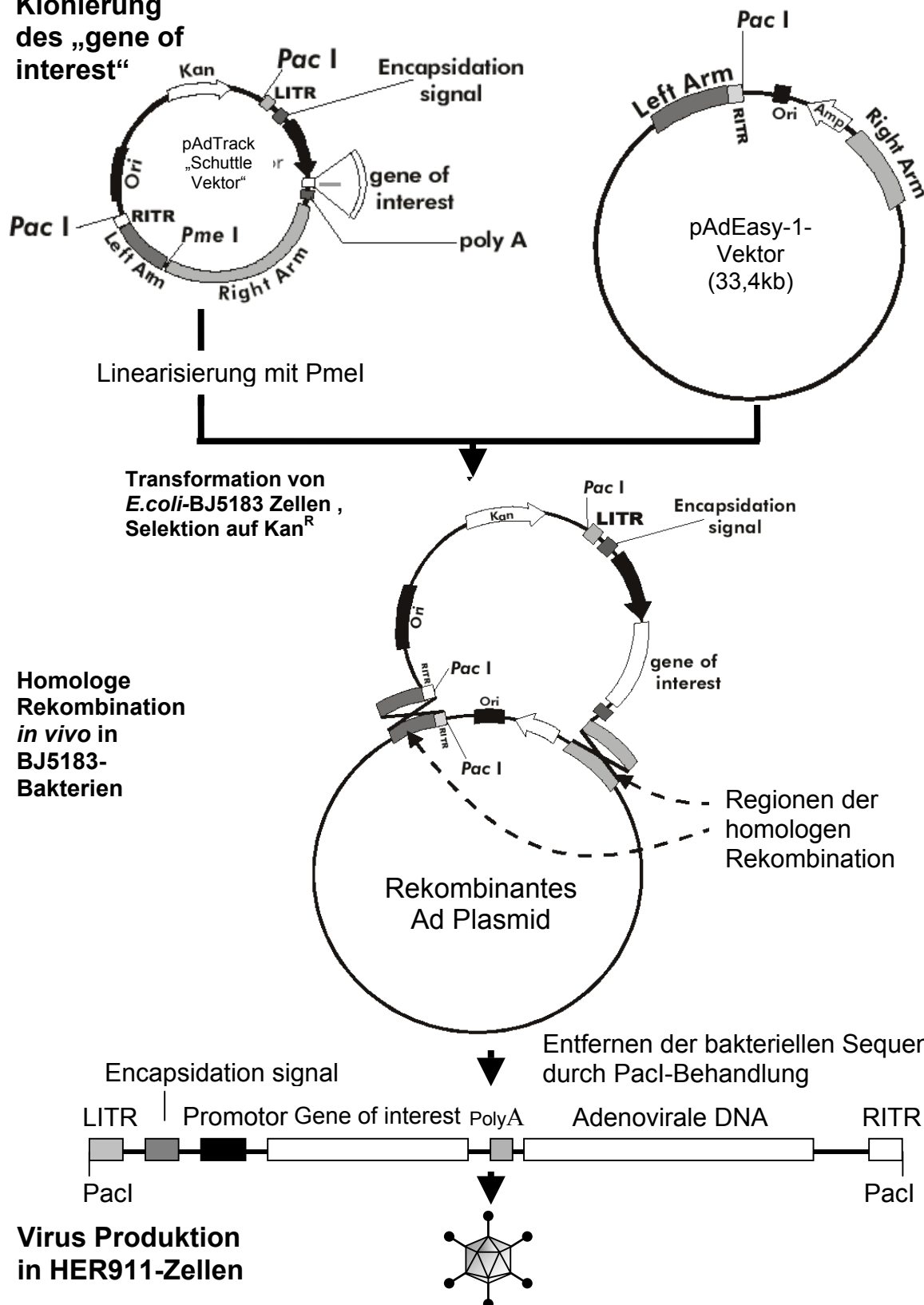
Der Test wurde mit dem Luciferase Assay Kit von Promega in 96-Loch-Platten durchgeführt. Alle Schritte wurden dem Handbuch entsprechend durchgeführt.

#### 4.2.23      **Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem AdEasy-System**

Mit dem AdEasy-System (*He et al., 1998*) ist es möglich relativ einfach rekombinante Adenoviren herzustellen, welche zusätzlich das GFP („green fluorescent protein“) und ein weiteres gewünschtes Protein exprimieren. Dafür wird das zu exprimierende Transgen („gen of interest“) in einen Shuttle-Vektor (pAdTrack) kloniert und dieser mit einem das adenovirale Genom (ohne die E1-Region) tragenden Vektor (pAdEasy-1 Vektor) in den E.coli Stamm BJ5813 kotransformiert (Abbildung 4.2). Die Expressionskassette für das GFP ist dabei schon auf dem Shuttle-Vektor vorhanden. Das Resultat ist ein infektiöses, aber in normalen Zellen nicht mehr replikationsfähiges rekombinantes Virus, welches in den infizierten Zellen GFP und das „gene of interest“ (Transgen) exprimiert.



# Klonierung des „gene of interest“



**Abb. 4.2:** Schematische Darstellung der Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mit Hilfe des AdEasy™-Systems

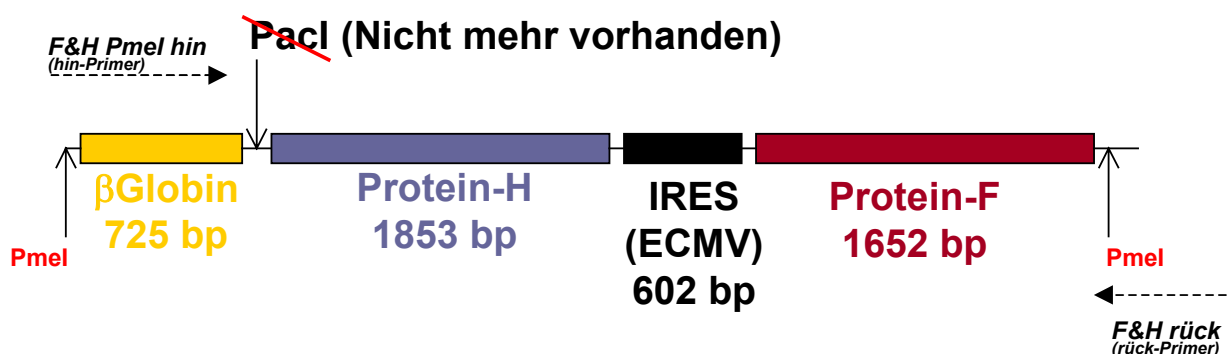
LITR: left inverted terminal repeat, RITR: right inverted terminal repeat, Poly A: Polyadenylierungssignal. Modifizierte Graphik aus der Beschreibung der AdEasy-Systems der Firma Clontech

#### 4.2.23.1 Generation von Rekombinanten Klonen in Bakterienzellen

#### 4.2.23.1.1 Erzeugung der Ad CMV F&H- und Ad MLP F&H-Vektoren zur Expression von Masernvirus F- und H-Proteinen

Zur Herstellung des Ad CMV F&H- bzw. Ad MLP F&H-Vektor wurden die Shuttle-Vektoren pAdTrack-CMV und pAdTrack-MLP benutzt, welche die gewünschten Transgene unter der Kontrolle eines CMV-Promoters (Cytomegalievirus-Promoter) bzw. adenoviralen MLP-Promoters („major late promoter“) exprimieren. Zur Expression von Masernvirus F- und H-Proteinen wurde das Plasmid pCG F&H (Aufmerksamkeit von Dr. Roberto Cattaneo, Mayo Clinic, Rochester, USA) verwendet, in welchen die PacI-Schnittstelle (1312 bp) durch PacI-Verdau, Auffüllen und Re-Ligation eliminiert wurde (Abb. 4.3). So entstand das Plasmid pCG F&H ΔPacI. Dieser Schritt war für die Herstellung der Vektoren nötig, weil das AdEasy-System einen anderen PacI-Verdau in der letzten Phase der Virus-Herstellung erfordert, damit die Ori-Kanamycin-Kassette des Shuttle-Vektors beseitigt und das gesamte Adenovirus-Genom vor der Transfektion in HER 911-Zellen linearisiert wird (Abb. 4.2). Die Kassette zur Expression von Masernvirus-Protein-F und -H wurde aus dem Plasmid pCG F&H ΔPacI PCR-amplifiziert. Die F&H-Expressionskassette wurde mit dem „PCR Long Template System“ von Roche amplifiziert, welches mit der Anwendung der *F&H PmeI hin*- und *F&H rück*-Primer ein 5089 bp-DNA-Fragment ergab. Die 5'-Enden des *F&H PmeI hin*-Primers enthielt eine Restriktionsschnittstelle für PmeI.

Die Struktur der amplifizierten Expressionskassette wird in Abbildung 4.3 gezeigt.

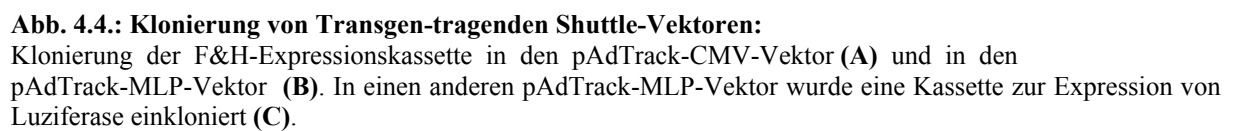


**Abb. 4.3: Amplifizierte Kasse zur Expression von Masernvirus-F und H-Proteinen:**

Die Expressionskassette wurde aus dem Plasmid pCG F&H ΔPacI mit der Verwendung der *F&H PmeI* hin- und *F&H rück-Primern* mit dem PCR Long Template System® amplifiziert. Die 5'-Enden des *F&H PmeI* *F&H-Primers* enthielten eine Restriktionsschnittstelle für *PmeI*. Eine *PmeI* Restriktionsschnittstelle ist an dem 3'-Extrem der Expressionskassette schon in dem pCG F&H ΔPacI vorhanden. Nach PCR-Amplifizierung der Expressionskassette wurde ein *PmeI*-Verdau zur Klonierung in die pAd Track-CMV und pAd Track-MLP durchgeführt.

Beide Fusionsproteine werden in einer einzigen mRNA transkribiert. Die  $\beta$ -Globin-Sequenzen dieses Transkriptes dienen als mRNA-Exportsignal. Die Anwesenheit eines IRES („internal ribosomal entry site“) zwischen den Sequenzen zur Expression von F- und H-Proteinen wurde als bi-systronisches Element eingesetzt. Auf diese Art werden beide Proteine im Cytoplasma aus diesem Transkript effizient tradiziert.

Die amplifizierte Expressionskassette wurde mit PmeI-Restriktionsenzym behandelt, um stumpfe Enden an den Extremen der Expressionskassette zu erzeugen. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wurde das PmeI-geschnittene Fragment in das pAd Track-CMV- bzw. pAd Track-MLP-Plasmid inkloniert, die vorher mit EcoRV-Restriktionsenzym geschnitten und mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert wurden (Abb. 4.4 A und B). Die richtige Orientierung der Expressionskassette in beiden Shuttle-Vektoren wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung festgestellt (*pAdTrackCMVseq-* und *pAdTrackMLPseq-Primer*).



#### 4.2.23.1.2 Erzeugung des Ad MLP Luc<sup>+</sup>-Vektors zur Expression von Luziferase

Zur Herstellung des Ad MLP Luc<sup>+</sup>-Vektors wurde der Shuttle-Vektor pAd Track-MLP verwendet, welcher Transgene unter der Kontrolle des adenoviralen MLP-Promoters („major late promoter“) exprimiert. Zur Expression von Luziferase wurde das Reporter-Plasmid pGL3-Basic (Clontech) verwendet, welches die Sequenzen zur Expression von Luziferase (Luc<sup>+</sup>) enthält. Durch Verdau mit den HindIII- und XbaI-Restriktionsenzymen wurde die Luziferase-Expressionskassette (Luc<sup>+</sup>-Kassette) aus dem pGL3-Basic-Plasmid geschnitten. Dieses Restriktionsprodukt ergibt nach einer elektrophoretischen Auftrennung im Agarose-Gel eine 1689 bp-Bande, die aus der Agarose isoliert wurde. Die HindIII- bzw. XbaI-Überhänge wurden mit Pfu-Polymerase gefüllt und die Kassette in das pAd Track-MLP-Plasmid einkloniert. Hier wurde ebenfalls das pAd Track-MLP-Plasmid mit EcoRV-Restriktionsenzym vorbehandelt (Abb 4.4. C)

Die richtige Orientierung der Luc<sup>+</sup>-Expressionskassette in dem Shuttle-Vektor pAd Track-MLP wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung festgestellt (*pAdTrackMLPseq-Primer*).

#### 4.2.23.1.3 Homologe Rekombination in Bakterien (pAdEasy-1/BJ5183)

Die klonierten Shuttle-Vektoren mit den zusätzlichen Genabschnitten (pAdTrack-CMV F&H, pAdTrack-MLP F&H und pAdTrack-MLP Luc<sup>+</sup>) werden nun mit dem Restriktionsenzym PmeI linearisiert, mit Phenol/Chloroform gereinigt und mit Ethanol gefällt. Die Fragmente wurden in einen Stamm elektrokompenter *E.coli* BJ5183 (pAdEasy-1) transformiert. Diese elektrokompenten Bakterien ermöglichen die homologe Rekombination zwischen den Shuttle-Vektoren und dem in den Bakterien inkorporierten adenoviralen Plasmid, pAdEasy-1-Vektor (Abb. 4.2.). Die Transformation mittels Elektroporation findet in 2.0 mm Küvetten bei 2500V, 200 Ohm und 25µFD in einem Bio-Rad Gene-Pulser statt. Der Transformationsmix wird danach in 500µl LB-Medium resuspendiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird das Medium auf 4-5 LB-Kanamycin Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank belassen.

Nun werden die 10-20 kleinsten Kolonien (es handelt sich um ein sehr großes Plasmid, somit haben die Kolonien einen Wachstumsnachteil und wachsen sehr langsam) gepickt und in 2ml LB-Medium welches 25 µl Kanamycin enthält für 10-15 Stunden bei 37°C geschwenkt und vermehrt. Die erhaltenen Plasmide werden mit PacI verdaut, welches die überflüssige Kanamycinresistenz ausschneidet und dann auf einem Gel betrachtet. Richtige Klone

enthalten außer dem großen Frangment von ca. 30kb noch ein kleines Fragment von ca. 3 - 4,5 kb. Ein solcher Klon wird dann Ethanol präzipitiert und mit Lipofektamin Plus in HER-911-Zellen transfiziert.

#### **4.2.23.1.4 Produktion von Viren in HER-911-Zellen**

Die HER-911-Zellen exprimieren konstitutiv die E1A- und E1B-Region des Adenovirus. In ihnen kann somit das rekombinante Virus, welchem die E1-Region fehlt, trotzdem vermehrt und expandiert werden. Dazu sollten ca.  $2 \times 10^6$  in eine mittlere Flasche ausgesät und über Nacht bei 37°C belassen werden. Die Zellen in der Flasche sollten zu 70%-80% konfluent sein. In den Zellen kommt es dann zur Expression der viralen Proteine und zur Vermehrung der sich daraus formenden Viren. Die gelungene Transfektion und die beginnende Virusproduktion können über die Expression des GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Nach 7 – 10 Tagen werden die noch auf dem Boden haftenden Zellen mit einem Schaber steril entfernt und die Zellen mit dem Medium in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Zellen werden nun zentrifugiert und kurz mit sterilem PBS<sup>def</sup> gewaschen. Danach werden die Zellwände durch vier maliges Frieren-Tauen aufgebrochen und die Zelltrümmer kurz herunterzentrifugiert. Dieser Überstand kann nun wiederum auf mehrere mittlere Flaschen bzw. später auf großen Flaschen expandiert werden.

#### **4.2.23.1.5 Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks**

HER-911-Zellen werden in großen Flaschen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zu etwa 90% konfluent sind (ca.  $10^7$  Zellen). Um einen suffizienten Virustiter zu erhalten reichen normalerweise 10 – 15 große Flaschen. Die Zellen werden dann mit einer m.o.i. (multiplicity of infection) von 5 bis 10 pro Zelle infiziert. Nach ca. 3 – 4 Tagen haben sich fast alle Zellen vom Untergrund gelöst und schwimmen in der Flasche. Restliche Zellen werden mit einem sterilen Schaber von Untergrund gelöst. Die Zellen werden mit dem Medium in 50 ml Falcon-Tubes gegeben und kurz abzentrifugiert. Danach wird das Pellet 2 mal kurz mit PBS<sup>def</sup> gespült und erneut runterzentrifugiert. Das Pellet wird pro Falcon-Tube mit 400 – 500 µl sterilem PBS<sup>def</sup> resuspendiert und die Zellwände durch 3 maliges Frieren-Tauen „aufgeknackt“. Danach werden die Zelltrümmer kurz herunterzentrifugiert und der Überstand mit den Viren in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Virussuspensionen werden vereint und der Titer der Viren wird bestimmt.

### **4.3 Arbeiten mit Proteinen**

#### **4.3.1 Ernte von Zellen für anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Zellen wurden kurz in PBS<sup>++</sup> gewaschen. Dann wurden die Zellen in 200 µl RIPA-Puffer/6well lysiert und mit einem Zellschaber vollständig vom Gefäßboden gelöst. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß transferiert, und 50 µl 6x Laemmli-Puffer wurden zugesetzt. Vor Zugabe des Laemmli-Puffers besteht die Möglichkeit, die Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode zu bestimmen (4.3.7).

Die Proben wurden 3 min. bei 95°C gekocht, für eine halbe Stunde bei 4°C geschüttelt und anschließend für 15 min. bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert, um die genomische DNA zu scheren und die Viskosität des Lysats zu reduzieren.

#### **4.3.2 Biotinylierung von Proteinen der Zelloberfläche**

Membranproteine der Zelloberfläche (z.B. F und H) lassen sich mit Sulfo-NHS-Biotin markieren (*Lisanti et al., 1988*). Hierzu wurden konfluente Zellrasen 3x mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend 2x mit 1ml S-NHS-Biotin (2 mg/ml PBS<sup>++</sup>) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Markierung wurden die Zellen 1x mit PBS<sup>++</sup>/0,1 M Glyzin und 3x mit PBS<sup>++</sup> gewaschen, um freies Biotin zu inaktivieren und zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen mit 0,5 ml RIPA-Puffer (pH 8,5) 1 Stunde auf Eis lysiert und unlösliches Material durch Zentrifugation (20 000 g, 45 Min., 4°C) entfernt. Das Lysat konnte nun für Immunpräzipitationen verwendet werden.

#### **4.3.3 Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation dient der Isolierung solubilisierter Proteine unter der Verwendung von Antikörpern. Dazu wurden zu einem Zelllysat monoklonale Antikörper (Verdünnung 1:100) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Protein-Antikörper-Komplexe wurden durch Inkubation (45 min., 4°C) mit Protein A-Sepharose gefällt und danach mehreren Waschschritten mit RIPA-Puffer unterzogen. Anschließend wurden die gefällten Proteine durch Aufkochen in SDS-Probenpuffer von der Protein A-Sepharose eluiert. Die Proben wurden entweder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

#### 4.3.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Gele bestanden aus einem 5 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel.

Sammelgel:	6,8 ml	dH <sub>2</sub> O
	1,7 ml	30 % Acrylamid-Lösung
	1,25 ml	1 M Tris-Puffer (pH 6,8)
	100 µl	10 % SDS
	100 µl	10 % Ammoniumpersulfat
	20 µl	TEMED
Trenngel:	7,9 ml	dH <sub>2</sub> O
	6,7 ml	30 % Acrylamid-Lösung
	5,0 ml	1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)
	250 µl	10 % SDS
	125 µl	10 % Ammoniumpersulfat
	12,5 µl	TEMED

Je nach Taschengröße wurden 20 µl (15er Kamm) oder 60 µl (10er Kamm) der vorbereiteten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Protein-Laufpuffer bei 120 V und maximaler Stromstärke.



#### 4.3.5 Western Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE (4.3.4) aufgetrennt worden sind, können spezifisch durch Immunfärbung visualisiert werden. Dazu müssen sie zunächst aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden.

Aufbau:

<b>Anoden-Seite</b>
Schwamm
2 Blatt Whatman-Papier
Nitrocellulose-Membran
Polyacrylamid-Gel
2 Blatt Whatman-Papier
Schwamm
<b>Kathoden-Seite</b>

Die Komponenten des Blots müssen ausreichend in Western-Puffer getränkt sein. Beim Aufbau muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulose entstehen und die Membran nicht trocken wird. Der Blot wird in einem Plastikhalter fixiert und in die Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 37 V und maximaler Stromstärke.

#### 4.3.6 Ponceau S-Färbung von Western Blots

Mit Ponceau S-Lösung (0,1 % Ponceau S (w/v) in 1 % Essigsäure) lassen sich Proteine unspezifisch sichtbar machen. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Western Blot mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und 1 min. in der Färbelösung geschwenkt. Danach wurde die Membran so lange mit dH<sub>2</sub>O entfärbt, bis die Proteinbanden klar hervortraten. Der Blot wurde jetzt in Folie geschlagen und mit Hilfe eines Kopierers oder Scanners dokumentiert. Die Ponceau S-Färbung wurde anschließend durch Waschen in PBS<sup>++</sup>/0,1 % Tween rückgängig gemacht.

#### 4.3.7 Immunfärbung des Blots

Die Seite der Nitrocellulose-Membran, auf die die Proteine transferiert worden waren, wurde mit Bleistift markiert. Die Membran wurde kurz in PBS<sup>++</sup>/0,1 % Tween gewaschen und von Gelresten befreit. Die Membran wurde zunächst in Milch-Lösung (PBS<sup>++</sup>/0,1 % Tween/5 %

Magermilchpulver) inkubiert, um freie, unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose abzusättigen. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte ebenfalls in Milch-Lösung.

Blocken in Milch-Lösung	30 min.
1. Antikörper (Verdünnung je nach Antikörper, s. Tabelle)	2 Stunden
Waschen:	
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	3x kurz
Milch-Lösung	15 min.
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	3x kurz
Milch-Lösung	15 min.
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	3x kurz
2. Antikörper (anti-IgG, speziesspezifisch, Peroxidase-gekoppelt)	1 Stunde
Waschen:	
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	3x kurz
Milch-Lösung	15 min.
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	3x kurz
Milch-Lösung	15 min.
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	3x kurz
Milch-Lösung	15 min.
PBS <sup>++</sup> /0,1 % Tween	4x kurz

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die beiden Komponenten des SuperSignal® West Dura Kits im Verhältnis 1:1 gemischt, sofort auf die Nitrocellulose-Membran pipettiert und in eine Plastikfolie eingeschweißt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt das Substrat in einer enzymatischen Reaktion um, was schließlich zu einer Lichtreaktion führt. Das emittierte Licht wurde mit einem Röntgenfilm (BIOMAX MR) detektiert.

#### **4.3.8 Nachweis biotinylierter Proteine auf Nitrocellulose**

Biotinylierte Proteine können auf Nitrocellulose-Membranen mit Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen werden. Dazu werden Nitrocellulose-Membranen abgesättigt, gewaschen und für 45 min bei 4°C mit Streptavidin-Peroxidase-Komplex (1:2000 in PBS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween wurde die gebundene Peroxidase mit dem SuperSignal® West Dura Kit nachgewiesen.

#### **4.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Diese Methode basiert auf der Bindung eines Farbstoffes vorwiegend an basische und aromatische Aminosäuregruppen, wobei eine Farbänderung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration erfolgt. Das Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 595 nm. Der Bio-Rad Protein Assay wird zum Abgleich der Proteinmengen vor dem Luziferase-Test verwendet.

Dazu wurde das Farbstoff-Konzentrat zunächst 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. 5 µl des Zelllysats wurden in eine 1,5 ml-Plastikküvette pipettiert und mit 1 ml der gebrauchsfertigen Farbstofflösung versetzt. Im Photometer wurde die Absorption der Proben bei 595 nm bestimmt.

#### **4.3.10 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Biuret-Reaktion**

Grundlage dieser Methode ist die Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine in alkalischem Medium. Die Cu<sup>+</sup>-Konzentration kann nach Chelatbildung mit Bicinchoninsäure kolorimetrisch bestimmt werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten in RIPA-Puffer wurde der Pierce BCA Protein Assay verwendet.

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Dann wurden 50 µl Zelllysate in eine 1,5 ml-Plastikküvette pipettiert und mit 1 ml der gebrauchsfertigen Arbeitslösung versetzt. Die restlichen Schritte erfolgten wie im Handbuch beschrieben. Die Bestimmung der absoluten Proteinwerte erfolgte durch Vergleich mit einer parallel erstellten Eichgeraden auf der Basis unterschiedlich konzentrierter BSA-Lösungen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Herstellung fusionsfähiger adenoviraler 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren

#### 5.1.1 Die Herstellung von den fusionsfähigen, adenoviralen 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren *Ad CMV F&H* und *Ad MLP F&H* kann im Kontext der Fusion erfolgen

Zur Herstellung von 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren (*Ad Easy System*) wurden die adenoviralen Plasmide pAd CMV F&H und pAd MLP F&H durch einen Pac-I-Verdau linearisiert. Das resultierende Konstrukt trägt das gesamte Adenovirus-Genom, in welchem die E1-Region deletiert und statt dessen die Sequenzen zur Expression der Fusionsproteine inseriert wurden. Außerdem tragen diese Konstrukte eine Kasse zur Expression von GFP (*green fluorescent protein*). Dieses Konstrukt soll dann in Zellen transfiziert werden, die konstitutiv die E1-Region der Adenoviren exprimieren (HER-911- bzw. 293-Zellen). Nur auf dieser Art kann die Entstehung dieser Viruspartikel und ihre Replikation gewährleistet werden. Die Erzeugung von Viruspartikeln kann erfahrungsgemäß zwischen 7 und 11 Tagen dauern, nach welchen durch weitere Vermehrung der Viren in entsprechenden Zellen und anschließender Ankonzentrierung und Reinigung hochtitrige Virusstocks für weitere Experimente entstehen. Die Herstellung fusionsfähiger Adenoviren stellt eine interessante Herausforderung dar, nämlich die Erzeugung von Viruspartikeln unter Bedingungen, die für die Zellen in dem Kontext einer Synzytienbildung beeinträchtigend sind.

Adenovirale 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren, die in ihren Genomen gleichzeitig für die Masernvirus-Proteine F und H unter der Wirkung eines CMV-Promotors kodieren, werden in den ersten Stunden nach der Transfektion in HER 911-Zellen (*Packaging-cells*) diese Fusionsproteine stark exprimiert, so das die Entstehung dieser Viren durch die Fusion gefährdet werden könnte.

Ein ähnliches Problem könnte ebenfalls jene adenoviralen Vektoren betreffen, die F- und H-Proteine unter der Kontrolle eines *Major Late Promoters (MLP)* exprimieren. Es ist jedoch zu erwarten, dass die F- und H-Synthese erst in der späten Phase der Replikation, gleichzeitig mit der Entstehung fertiger Viruspartikel, auftreten wird. Trotzdem könnte eine basale unspezifische Aktivität des MLP-Promotors eventuell zur Expression dieser Proteine führen und weiterhin die vorzeitige Fusion der *Packaging-Zellen* auslösen.

Um den Einfluss der Fusion auf die Entstehungseffizienz dieser adenoviralen 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren zu untersuchen, wurden HER 911-Zellen mit äquivalenten DNA-Mengen der

adenoviralen Plasmide *pAd1 CMV F&H* und *pAd1 MLP F&H* transfiziert (Abb. 5.1 A) und diese in Anwesenheit oder Abwesenheit von fusionsinhibierenden Konzentrationen des FIP-Peptides weiterkultiviert. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellrasen licht- und fluoreszenzmikroskopisch beobachtet und photographisch dokumentiert. 11 Tage nach der Transfektion wurden die Zellrasen geerntet, eine Virus-Suspension hergestellt und diese titriert. Dieses Experiment wurde drei Mal durchgeführt, damit die Standard-Abweichung berechnet werden konnte.

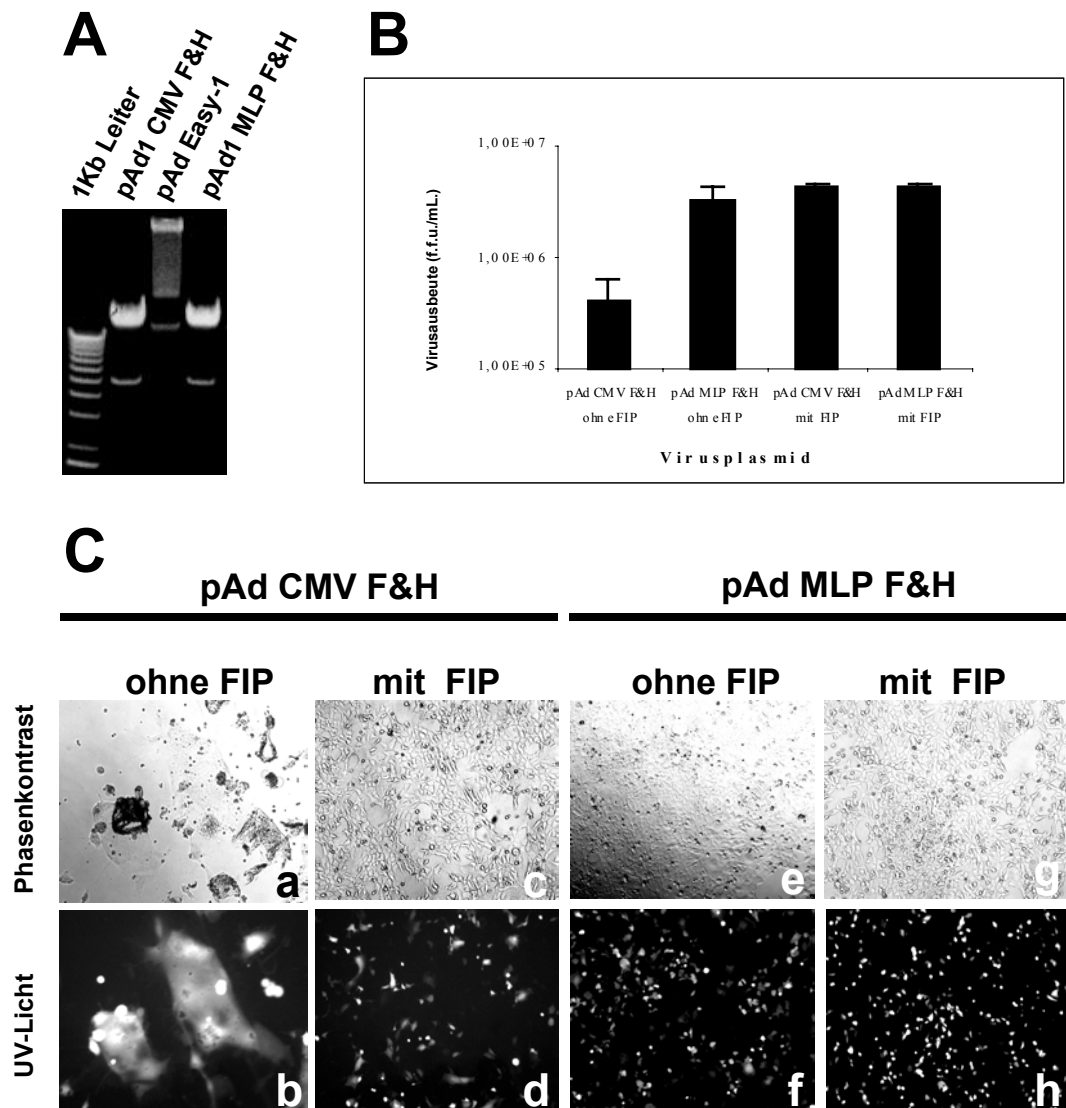
Die mit den adenoviralen Plasmiden transfizierten Zellrasen zeigen in der mikroskopischen Untersuchung erkennbare Unterschiede (Abb. 5.1 C) je nachdem, welche adenoviralen Plasmide (*pAd1 CMV F&H* oder *pAd1 MLP F&H*) in der Transfektion eingesetzt wurden oder ob FIP in das Zellkulturmedium gegeben wurde.

Jene Zellansätze, die in Abwesenheit von FIP mit *pAd1 CMV F&H* transfiziert wurden, zeigen „Fetzen“ eines durchfusionierten Zellrasens, der unter UV-Licht ein homogenes GFP-Signal zeigt (Abb. 5.1C a und b). In Anwesenheit von FIP sind die Zellrasen unbeschädigt, die Zellen behalten ihre morphologische Individualität und kleine Synzytien treten spärlich auf, in welchen nur ein Paar Zellen beteiligt sind (Abb. 5.1 C c und d).

Die mit *pAd1 MLP F&H* transfizierten Zellrasen zeigen im Vergleich zu denen, die mit *pAd1 CMV F&H* transfiziert wurden, keine großen Unterschiede zwischen FIP-behandelten (Abb. 5.1C g und h) und nicht-behandelten Zellrasen (Abb. 5.1C e und f). Auf diesem Zellrasen sind ebenfalls sehr kleine Synzytien selten zu erkennen.

Nach 11 Tagen wurden die Zellansätze schließlich mit einem Zellschaber geerntet und die gesamten Zellsuspensionen (Zellen + Zellmedium = 2 mL) in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (flüssiger Stickstoff/Wasserbad bei 37°C) lysiert. Durch Zentrifugation für 1 min. bei 14 000 rpm wurden die Zelltrümmer pelletiert und die Viren im Überstand auf Kammer-Objektträgern mit HER 911-Zellen titriert.

Die Zellansätze, die mit *pAd1 CMV F&H* transfiziert und in Abwesenheit von FIP aufbewahrt wurden, ergaben nach 11 Tagen eine Virusaussbeute (Mittelwert aus drei Versuchen) von  $4,17 \times 10^5$  f.f.u./mL (f.f.u. = *fluorescent forming units*). Die Virusaussbeute von denjenigen, die mit FIP inkubiert wurden, ist jedoch eine Log-Stufe höher,  $4,17 \times 10^6$  f.f.u./mL.



**Abb. 5.1: Transfektion von HER-911 Zellen zur Herstellung fusionsfähiger 1<sup>st</sup> Generation-Vektoren: Ad CMV F&H und Ad MLP F&H.** Zur Transfektion von HER-911 Zellen wurden am Vortag 200 000 Zellen/Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. Die zur Transfektion verwendeten Adenovirusplasmide -pAd1 CMV F&H und pAd1 MLP F&H- wurden mit Pac I-Restriktionsenzym geschnitten, um linearisiert zu werden. Die entsprechenden Restriktionsprodukte wurden mit Phenol-Chloroform gereinigt, mit Ethanol gefällt und die Pellets in Elutionspuffer gelöst. Vor der Vorbereitung der Transfektionsansätze wurde die DNA-Konzentration gemessen, auf ein 0,8% Agarose-Gel jeweils 2,4 µg beider Verdau aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Transfektion erfolgte jeweils mit 2,4 µg PacI-Verdau für DNA von Ad CMV F&H- bzw. Ad MLP F&H-Adenovirusplasmid und den entsprechenden Ansätzen von Lipofectamin Plus® Reagenzien, die in einem Transfektionsansatz zusammengestellt wurden. Diese wurden auf verschiedene Zelllöcher gegeben und bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Drei Stunden nach Beginn der Transfektiosprozedur wurden die Transfektionsansätze von den Zell-Löchern abgesaugt und 5 mL DMEM-FCS- bzw. DMEM-FCS-Zellmedium mit FIP (Endkonzentration=100µM) auf die transfizierten Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurden Fotoaufnahmen des transfizierten Zellrasens unter Licht- und UV-Mikroskop durchgeführt. 11 Tage nach der Transfektion wurden schließlich die Zellrasen geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese titriert.

**A** Kontrolle der angesetzten DNA-Verdaumengen auf 0,8% Agarose-Gel. Die dritte Spur enthält 2,4 µg des adenoviralen unverdauten Plasmids pAd Easy1, das als Kontrolle des Verdaus mitaufgetragen wurde. **B** Virusausbeute der Ad CMV F&H- und Ad MLP F&H-Viren. **C** Fotoaufnahmen der mit pAd CMV F&H und pAd MLP F&H transfizierten Zellrasen unter Licht- (oben) und UV-Mikroskop (unten), 24 Std. nach der Transfektion.

Im Vergleich zur Transfektion von pAd1 CMV F&H zeigen die mit pAd1 MLP F&H transfizierten Zellrasen bei der Virusaussbeute dennoch keine bedeutenden Unterschiede zwischen FIP-behandelten oder nicht-behandelten Zellansätzen. Beide ergeben Titer von  $4,17 \times 10^6$  f.f.u./mL beziehungsweise  $3,23 \times 10^6$  f.f.u./mL.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Fusion die Entstehung der Viruspartikel beider Vektoren, Ad CMV F&H und Ad MLP F&H, nicht unterbinden kann. Trotzdem kann die Fusions-Inhibierung durch FIP die Erzeugung der Viruspartikel im Fall von Ad CMV F&H erheblich verbessern, wie auf der Abb. 5.1B gut zu erkennen ist. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die unter CMV-Promotor kontrollierte Expression der Fusionsproteine zu einer sehr frühen Fusionsauslösung führen kann. Dementsprechend werden die Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach der Transfektion komplett fusioniert und aufgrund dessen kann die Virusentstehung beeinträchtigt werden.

Andere Merkmale wird die Erzeugung von Ad MLP F&H aufweisen. Wie oben erläutert wurde, werden in diesem Vektor die F- und H-Proteine unter dem Stimulus des MLP-Promoters exprimiert. Weder zeigen die Zellrasen in den ersten Stunden nach der Transfektion große Synzytien noch durchfusionierten Zellrasen. Dieses Phänomen lässt sich damit erklären, dass die Virusaussbeute keine großen Unterschiede bei der Inhibierung der Fusion durch FIP zeigt. Das Auftreten kleiner Synzytien spricht hier dafür, dass die MLP-Sequenzen der Expression von F- und H-Proteinen eine leichte basale Aktivität verleihen.

## **5.2 Charakterisierung des 1<sup>st</sup> Generations-Vektor Ad CMV F&H**

### **5.2.1 Expression von F- & H-Fusionsproteinen des adenoviralen Vektors *Ad CMV F&H* und ihre Auswirkung auf die Zellmorphologie im Vergleich zu dem nicht-fusionsfähigen Vektor, *Ad CMV $\beta$ Gal***

Wie schon betrachtet wurde, kann die Expression der Fusionsproteine im Rahmen einer Transfektion die Morphologie der HER-911-Zellen radikal verändern. Dennoch ist die Entstehung der Viruspartikel im Kontext der Fusion zu erreichen.

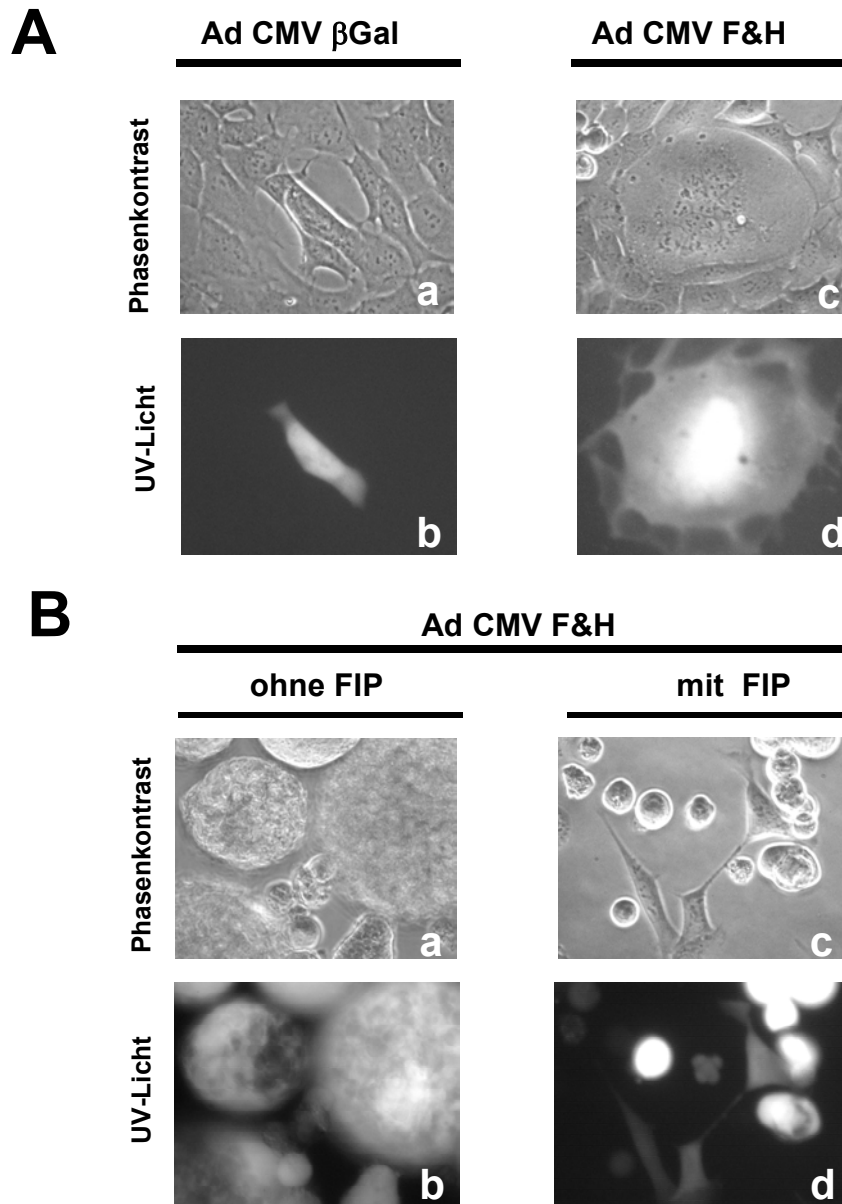
Die aus der Viruszucht erhaltenen Viruspartikel wurden zunächst auf HER-911-Zellen in großen Zellkultur-Flaschen vermehrt. Die infizierten Zellen wurden stets in DMEM-FCS-Medium mit FIP-Ethanol (FIP 100 $\mu$ M; Ethanol 1,7 mM) inkubiert. Nach 3 Tagen, bei Auftreten der typischen adenoviralen zytopathischen Effekte, wurde schließlich eine hochkonzentrierte Virussuspension als Virusstock hergestellt.

Damit die zytopathischen Effekte der fusionsfähigen Vektoren mit anderen, nicht-fusionsfähigen Vektoren verglichen werden können, wurden gleichzeitig Zellansätze mit

einem nicht-fusionsfähigen Vektor, nämlich Ad CMV  $\beta$ Gal, und dem fusionsfähigen Vektor Ad CMV F&H bei einer m.o.i. von 0,01 infiziert. Diese infizierten Zellrasen wurden nach den ersten 24 Stunden p.i. unter Licht- bzw. UV-Mikroskop untersucht und eine Photoaufnahme gemacht. Wie in der Abb. 5.2A gut zu erkennen ist, zeigen die Ad CMV  $\beta$ Gal-infizierten Zellen zwar in den ersten 24 Stunden unter Licht-Mikroskopie (Abb. 5.2A a) noch keine erkennbaren zytopathischen Effekte, aber die Expression von GFP (*Green fluorescence protein*) lässt sich unter UV-Licht (Abb. 5.2A b) feststellen. Im Gegensatz dazu zeigen die Ad CMV F&H-infizierten Zellen deutliche morphologische Veränderungen. Eine Fusionsinduktion ist hier am Auftreten von Synzytien zu erkennen, die zu diesem Zeitpunkt zwischen 4 und 10 benachbarte Zellen beteiligen. Somit kann die CMV-kontrollierte Expression der Fusionsproteine eine deutliche Synzytienbildung auslösen und dadurch die Zellmorphologie verändern. Die Expression von F- und H-Proteinen wird erwartungsgemäß augenblicklich nicht-infizierte Zellen in einem Synzytium einbeziehen. Dieses Phänomen hat für die Zytotoxizität der Vektoren eine große Bedeutung. Ein *Bystander-Effekt* (Freeman et al., 1993) wird induziert, indem die Lebensfähigkeit der nicht infizierten bzw. transduzierten Zellen durch die benachbarten, infizierten Zellen beeinträchtigt wird.

Um die Expression von Masernvirusprotein-F und -H von adenoviralen Vektoren bei einer hohen m.o.i. nachzuweisen und ihre Auswirkung auf die Zellmorphologie dokumentieren zu können, wurden Zellansätze von HER-911-Zellen mit einer m.o.i. von 10 infiziert und im Zellkulturmedium mit oder ohne Zugabe von FIP (Endkonzentration 100 $\mu$ M) weiterinkubiert. Auf dieser Art konnte die Inhibierung der von Adenoviren induzierten Fusion untersucht werden. In der Abb. 5.2B (a und b) sind die Effekte der Fusion auf die infizierten HER-911-Zellen klar zu erkennen. Die exprimierte Menge von Fusionsproteinen löst die Fusion der Zellen mit großer Intensität aus, so dass die Adhäsion der fusionierten Zellen versagt und sich demzufolge diese Synzytien von dem Boden trennen und im Medium schwimmen. Ein Resultat dieses Phänomens ist die Entstehung von Zellklumpen, die als „Schneebälle“ bezeichnet wurden. Sie werden im weiteren Verlauf der Arbeit mehrfach erwähnt.





**Abb.5.2 : Expression von F- & H-Fusionsproteinen durch den adenoviralen Vektor *Ad CMV F&H* und ihre Auswirkung auf die Zellenmorphologie im Vergleich zu einem nicht-fusionsfähigen Vektor, *Ad CMV  $\beta$ Gal*.**

100 000 HER-911 Zellen/Loch wurden am Vortag in einer 12-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden zwei Ansätze jeweils mit Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal infiziert, beide bei einer m.o.i.=0,01. Darüber hinaus wurden diese infizierten Zellrasen im DMEM-FCS-Zellmedium weiter inkubiert. Parallel wurden ebenfalls zwei andere Zellansätze nur mit Ad CMV F&H bei m.o.i.=10 infiziert. Drei Stunden nach Beginn der Infektionsprozedur wurde 1 mL DMEM-FCS- bzw. DMEM-FCS-Zellmedium mit FIP (Endkonzentration=100 $\mu$ M) jeweils auf beide Zellrasen gegeben. 24 Stunden p.i. wurden die infizierten Zellrasen unter Licht- bzw. UV-Mikroskop (X 64) untersucht. **A** Fotoaufnahme der HER-911 infizierten Zellrasen, die mit Ad CMV F&H (**a,b**) und Ad CMV  $\beta$ Gal (**c,d**) bei m.o.i.=0,01 infiziert wurden. **B** Fotoaufnahme der mit Ad CMV F&H infizierten HER-911-Zellrasen -m.o.i.=10-, (**a**) mit FCS-DMEM- und (**b**) mit DMEM-FCS-FIP-Zellmedium.

Verglichen mit diesen Zellansätzen, die in der Abwesenheit von FIP inkubiert wurden, zeigen die mit FIP inkubierten Zellrasen zwar runde, kugelförmige Zellen (typischer zytopathischer Effekt von Adenoviren), aber keine Synzytien. Dies beweist, dass auch im Kontext einer adenoviralen Infektion mit fusionsfähigen Adenoviren die Fusion durch FIP inhibierbar ist (Abb. 5.2B c und d).

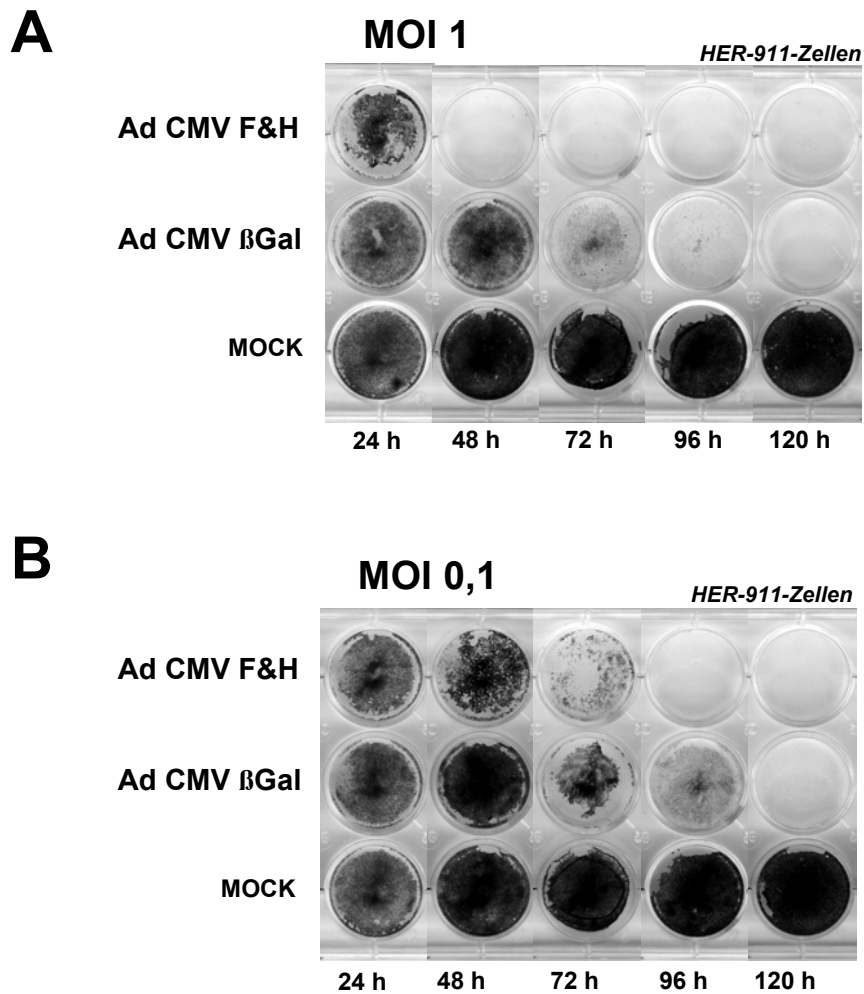
### **5.2.2 Zytotoxizität der adenoviralen Vektoren *Ad CMV F&H* und *Ad CMV βGal* auf HER-911- bzw. -293-Zellen in einem bi-dimensionalen Modell**

Die Infektion von F&H-exprimierenden Vektoren führt zur Fusion von infizierten Zellen mit benachbarten Zellen, die in ein Synzytium inkorporiert werden. So könnte die Fusion eine gute Alternative sein, um die Zytotoxizität von onkolytischen Adenoviren zu verbessern.

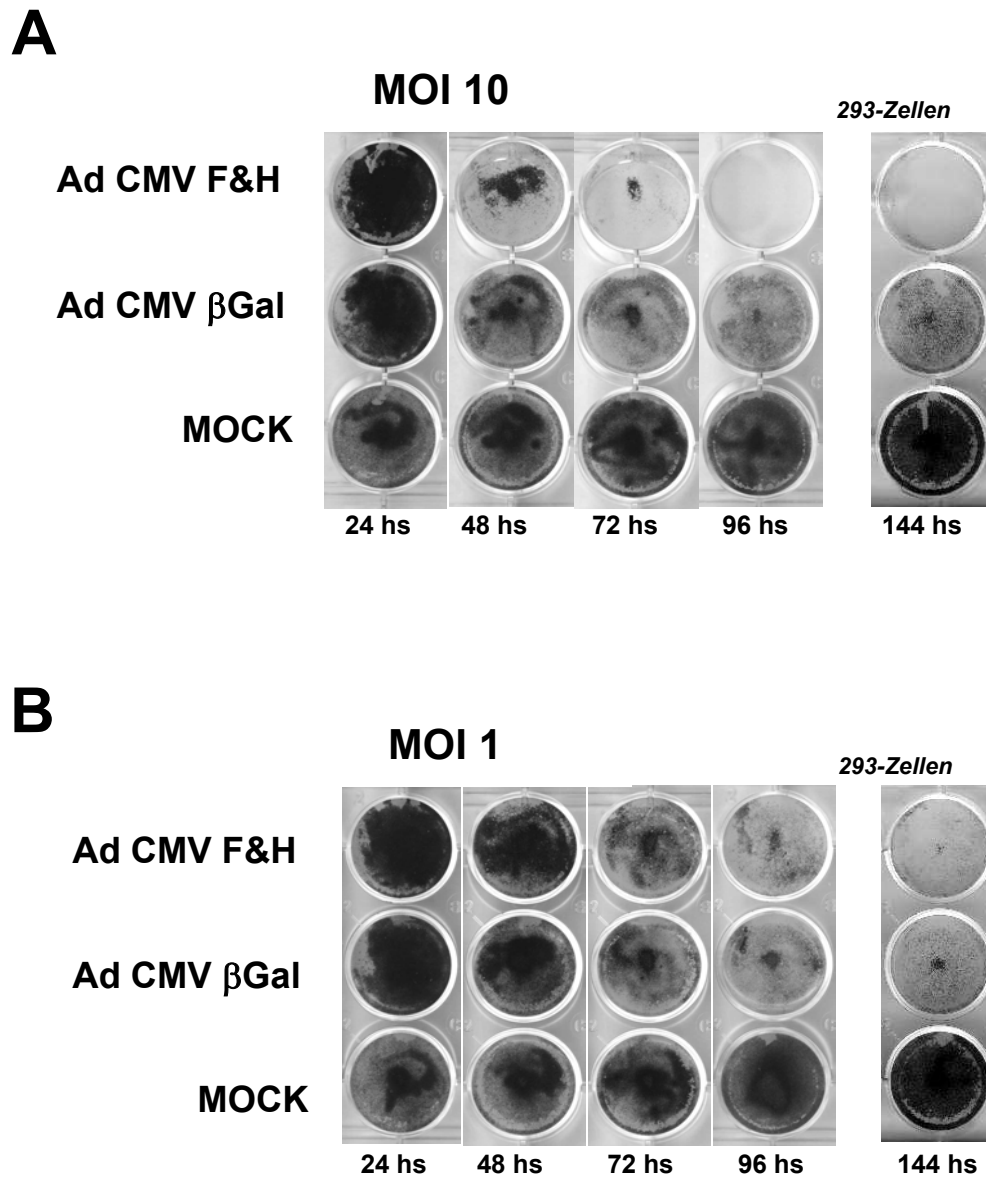
Um die Zytotoxizität der fusionsfähigen Rekombinanten in einem bi-dimensionalen Modell zu untersuchen, wurden Ansätze von permissiven Zellen, nämlich HER-911- bzw.-293-Zellen, mit *Ad CMV F&H* und *Ad CMV βGal* mit zwei verschiedenen m.o.i.s infiziert, wie in den Abbildungen 5.3 und 5.4 gezeigt ist. Somit wurde ein Experiment etabliert, in welchem sich die Zytotoxizität eines fusionsfähigen Vektors mit einem nicht-fusionsfähigen betrachten lässt.

In HER-911-Zellen zeigt *Ad CMV F&H* eine hohe Zytotoxizität in Vergleich zu *Ad CMV βGal*. Die Zellrasen, die mit *Ad CMV F&H* infiziert wurden, zeigen in den ersten 48 Stunden kleine Plaques, die offenbar eine Folge des Platzens bzw. Auflösens der Synzytien sind.

Ähnlich zeigt sich die Zytotoxizität von *Ad CMV F&H* in 293-Zellen, obwohl höhere m.o.i.'s nötig waren, um die Superiorität des fusionsfähigen Vektors gegenüber *Ad CMV βGal* zu beobachten.

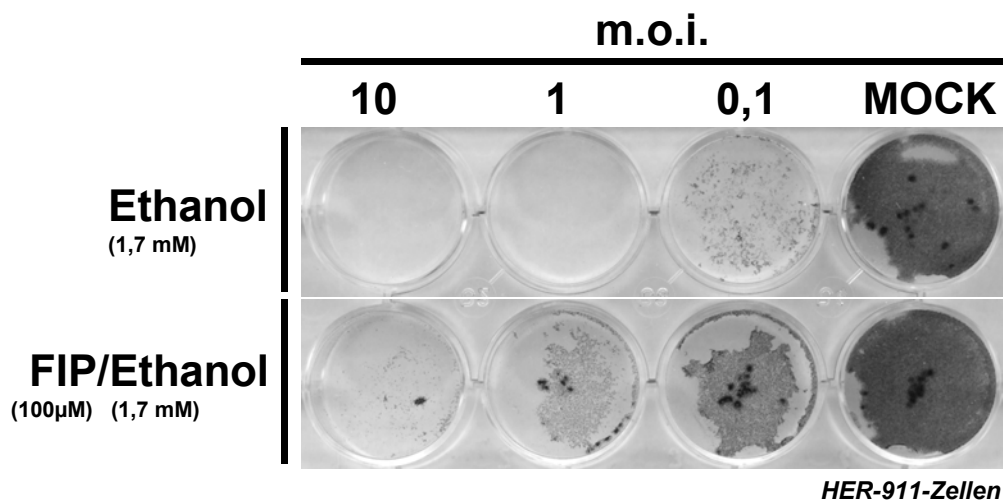


**Abb. 5.3: Zytotoxizität der adenoviralen Vektoren *Ad CMV F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* auf HER-911-Zellen in einem bi-dimensionalen Modell.** 200 000 HER-911-Zellen wurden am Vortag in 10 12-Loch-Platten ausgesät. Für dieses Experiment wurde in jeder Platte nur die erste Drei-Löcherreihe mit Zellen besetzt. Am nächsten Tag wurde von der gesamten Plattenmenge eine Hälfte mit *Ad CMV F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* jeweils bei einer m.o.i.=1 und die andere bei einer m.o.i.=0,1 infiziert. Alle 24 Stunden wurde von beiden Gruppen jeweils eine Platte mit Kristall-Violett fixiert und gefärbt. **A** Anteil der bei m.o.i.=1 infizierten HER-911-Zellen. **B** Anteil der bei m.o.i.=0,1 infizierten HER-911-Zellen.



**Abb. 5.4: Zytotoxizität der adenoviralen Vektoren *Ad CMV F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* auf 293-Zellen in einem bi-dimensionalen Modell.** 200 000 293-Zellen wurden am Vortag in 10 12-Loch-Platten ausgesät. Für dieses Experiment wurde in jede Platte nur die erste Drei-Löcherreihe mit Zellen besetzt. Am nächsten Tag wurde von der gesamten Plattenmenge eine Hälfte mit *Ad CMV F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* jedes Mal bei einer m.o.i.=10 und die andere bei einer m.o.i.=1 infiziert. Nach 24-, 48-, 72-, 96- und 144 Stunden wurde von beiden Gruppen jeweils eine Platte mit Kristall-Violett fixiert und gefärbt. **A** Anteil der bei m.o.i.=10 infizierten 293-Zellen. **B** Anteil der bei m.o.i.=1 infizierten 293-Zellen.

Zum gleichen Zweck wurde ein anderes Experiment durchgeführt (Abb. 5.5), in welchem der fusionsfähige Vektor Ad CMV F&H zur Untersuchung seiner eigenen Zytotoxizität auf HER-911-Zellansätzen mit FIP-Ethanol-haltigem bzw. Ethanol-haltigem DMEM-FCS-Medium bei verschiedenen m.o.i.'s eingesetzt wurde. Hier lässt sich die Zytotoxizität der Fusion erkennen, da nach dem Zufügen von FIP zu dem Medium seine Fusionsfähigkeit gehemmt wird. Wie bereits erklärt, ist das Peptid FIP nur in Ethanol lösbar. So sind 5mg dieses lyophilisierten Peptides in 1 mL absolutem Ethanol lösbar und wird erst dadurch gebrauchsfertig. Bei der Verwendung dieser FIP-Lösung in Experiment enthalten die Zellmedien daher eine Endkonzentration von 1,7mM Ethanol. Folglich werden zur Kontrolle Zellansätze mit DMEM-FCS-Ethanol 1,7 mM behandelt, damit die Bedingungen dieses Experimentes vergleichbar sind. Zellrasen, die unter der Zugabe von FIP kultiviert wurden, weisen weniger Schäden als jene auf, die ohne dieses Peptids aufbewahrt wurden. Dieses Phänomen lässt sich bei hohen und niedrigeren m.o.i.'s deutlich beobachten. Aus den Ergebnissen dieses Experimentes ist abzuleiten, dass die Fusion ein entscheidender Faktor zur Verbesserung der Zytotoxizität in diesem Modell ist.



**Abb. 5.5: Zytotoxizität des adenoviralen Vektors *Ad CMV F&H* mit und ohne FIP-Zugabe (*Fusionsinhibierendes Peptid*):** Für dieses Experiment wurden am Vortag 200 000 HER-911-Zellen/Loch in eine 12-Loch-Platte ausgesät. Zwei Löcherreihen wurden mit absteigenden m.o.i.'s von *Ad CMV F&H* -nämlich 10; 1; 0,1; mock- infiziert. Drei Stunden nach Beginn der Infektion wurde auf eine Gruppe der Zellen 1mL DMEM-FCS-Ethanol (Endkonzentration von Ethanol=1,7mM) und auf die andere 1mL DMEM-FCS mit FIP-Ethanol (Endkonzentration von FIP=100µM und von Ethanol 1,7mM) gegeben. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit Kristall-Violett fixiert und gefärbt. Oben: Kristall-Violett-Färbung der mit *Ad CMV F&H* infizierten Zellen, die mit DMEM-FCS-Ethanol (oben) bzw. mit DMEM-FCS mit FIP (unten) inkubiert wurden.

### 5.2.3 Einfluss der Fusion auf die Replikation von adenoviralen 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren

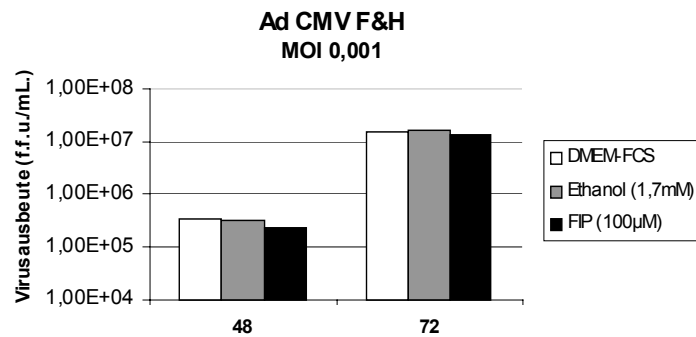
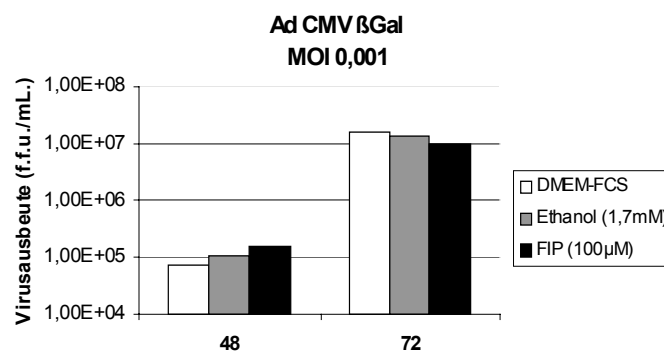
Die Fusion ist ein Phänomen, das nicht nur die Morphologie der Zellen verändert, sondern auch Depletion des ATP durch eine mitochondriale Dysfunktion auslöst (*Higuchi et al., 2000*). Diese molekularen Ereignisse führen zur Nekrose der fusionierten Zellen (*Nicotera et al., 1998*).

Aufgrund dieser Beobachtung könnte die Vermutung entstehen, dass die Replikationsfähigkeit der Adenoviren von der Fusion beeinträchtigt würde.

Um dies zu untersuchen, wurden HER-911-Zellen in mehreren Ansätzen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit Ad CMV F&H oder Ad CMV  $\beta$ Gal mit einer m.o.i. von 0,001. Drei Stunden nach der Zugabe der Virusansätze auf die Zellen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und entweder in DMEM-FCS bzw. DMEM-FCS-Ethanol (1,7mM) oder DMEM-FCS-Ethanol mit FIP weiter inkubiert, wie in der Abbildung 5.6 erklärt ist. Infolgedessen wurde nicht nur die Replikation von Ad CMV F&H unter Fusionsbedingungen untersucht, sondern auch unter jenen, die durch die Anwendung von FIP die Zellen vor der Fusion schützen. Der Vektor Ad CMV  $\beta$ Gal wurde als Kontrolle verwendet, damit die Wirkung der Behandlung von den verschiedenen Mediumansätzen bei einem nicht-fusionsfähigen Vektor evaluiert wird.

Aus den Ergebnissen dieses Versuches (Abb.5.6) wird klar, dass der fusionsfähige Vektor Ad CMV F&H in seiner Replikation keine großen Unterschiede unter den drei verschiedenen Bedingungen zeigt, weder 48 noch 72 Stunden nach der Infektion (Abb 5.6A).

Ähnliche Folgerungen ergeben sich aus der Replikation von Ad CMV  $\beta$ Gal (Abb. 5.6B). Hier scheinen die verschiedenen Mediumansätze auf die Replikation dieses nicht-fusionsfähigen 1<sup>st</sup> Generations-Vektors keinen Einfluss zu haben.

**A****B**

**Abb. 5.6: Replikation der adenoviralen Vektoren, *Ad CMV F&H* und *Ad CMV βGal*, in Anwesenheit und Abwesenheit von FIP (Fusionsinhibierendes Peptid).** Ansätze von HER-911-Zellen wurden bei m.o.i.=0,001 mit *Ad CMV F&H* (oben) oder *Ad CMV βGal* (unten) infiziert. Drei Stunden nach Infektionsbeginn wurden die infizierten Zellen parallel mit DMEM-FCS, DMEM-FCS-Ethanol (1,7mM) und DMEM-FCS-Ethanol mit FIP (100µM) behandelt. Nach 48 h und 72 h wurde ein Ansatz geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese titriert. Dargestellt sind die ermittelten Virustiter (y-Achse) nach 48 h- und 72 h (Zeit [h], x-Achse). **A** Replikation von *Ad CMV F&H*. **B** Replikation von *Ad CMV βGal*.

Eine zweite Phase dieser Charakterisierung hatte zum Zweck, die Replikation von Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$  Gal miteinander zu vergleichen. Darum wurde ein komparatives Experiment durchgeführt, in welchem die Replikationsparameter von Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal parallel dargestellt wurden. Wie in der Abbildung 5.7 erläutert ist, wurden mehrere Ansätze von HER-911-Zellen mit Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal mit absteigenden m.o.i.'s  $10^{-10}$   $10^{-1}$   $0,1$   $0,01$ - infiziert. Die infizierten Zellen wurden in diesem Versuch nur mit normalem DMEM-FCS behandelt. Daher hatte die Infektion mit Ad CMV F&H zu einer klaren Fusion geführt. Alle 48 h wurde ein Ansatz geerntet, eine Virussuspension erstellt und diese titriert. Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt, damit eine Standardabweichung ermittelt werden konnte. Die Replikation von Ad CMV F&H zeigt im Vergleich mit Ad CMV  $\beta$ Gal keine große Unterschiede. Beide Viren replizieren bei hohen oder niedrigeren m.o.i.'s gleichmäßig. Dieses Phänomen lässt sich nach 48- (Abb.5.7A) und 96-Stunden (Abb. 5.7B) gleichermaßen beobachten.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Fusion keinen negativen Einfluss auf die Replikation des fusionsfähigen Ad CMV F&H-Vektors hat. Darüber hinaus kann die FIP-Zugabe die Replikation anderer nicht-fusionsfähigen Vektoren nicht beeinträchtigen.

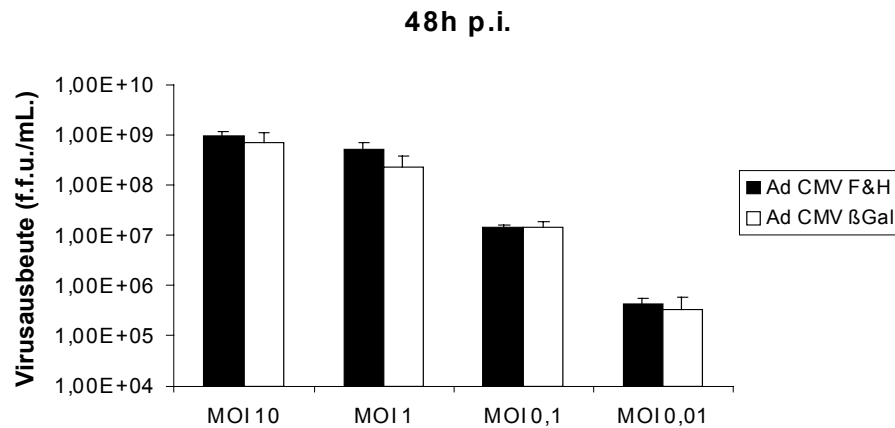
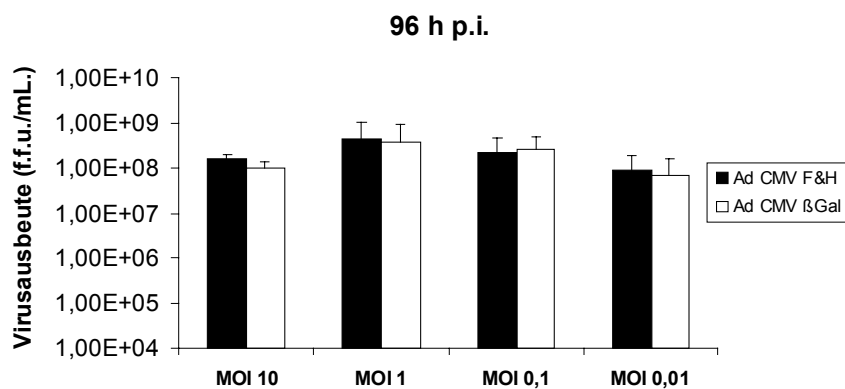
### **5.3 Etablierung eines Koinfektionsmodells mit fusionsfähigen Vektoren**

#### **5.3.1 Koinfektionsmodell eines replikationsfähigen Adenovirus (*Ad dl 309*) in Kombination mit fusions- und nicht-fusionsfähigen 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren (*Ad CMV F&H* bzw. *Ad CMV $\beta$ Gal*)**

Der fusionsfähige Vektor wird in seiner Replikationsfähigkeit in permissiven Zellen von der Fusion nicht beeinträchtigt. Gleichzeitig wird durch eine erhöhte Zytotoxizität eine Verbesserung der Effizienz erreicht. 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren werden nur in permissiven Zellen dazu fähig sein, eine aktive Replikation voranzutreiben. Wie im Verlauf dieser Doktorarbeit schon erörtert wurde, wird die in diesen Vektoren vorhandene Deletierung der E1-Region nur von einer in den permissiven Zellen konstitutiven Expression dieser Gen-Produkte komplementiert.

Fusionsfähige Vektoren wären möglicherweise in der Lage, im Rahmen eines Koinfektionsmodells mit replikationsfähigen Adenoviren die Zytotoxizität zu steigern.



**A****B**

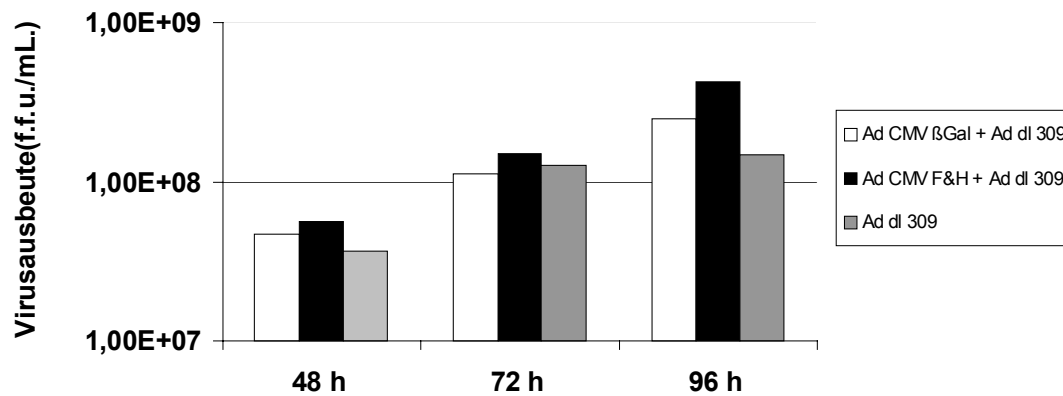
**Abb. 5.7: Einfluss der Fusion auf die Replikation von adenoviralen 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren in HER-911-Zellen.** Mehrere Ansätze von HER-911-Zellen wurden mit Ad CMV F&H (■) und Ad CMV βGal (□) mit absteigenden m.o.i.'s -10 1 0,1 0,01- infiziert. Die infizierten Zellen wurden nur mit normalem DMEM-FCS behandelt. Alle 48 h wurde ein Ansatz geerntet, eine Virussuspension erstellt und diese titriert. Dieses Experiment wurde drei Mal durchgeführt, damit eine Standardabweichung ermittelt werden konnte. Dargestellt sind die entsprechenden Virustiter (Virusausbeute (f.f.u./mL.), y-Achse) zu verschiedenen m.o.i.'s (MOI, x-Achse). **A** Virusreplikation von Ad CMV F&H (■) und Ad CMV βGal (□) nach 48 Stunden und **B** nach 96 Stunden.

Auf diese Art und Weise werden replikationsfähige Adenoviren im Verlaufe der Infektion den Vektoren die synthetisierten E1-Produkte zur Verfügung stellen und folglich Ihre Aktivität und Replikation in nicht-permissiven Zelllinien gewährleisten.

Um den Einfluss der Fusion auf die Replikation von Adenoviren bei einer Koinfektion zu untersuchen, wurde das folgende Modell etabliert, in welchem auf nicht permissiven Zellen replikationsfähige Adenoviren (Ad dl309) in Kombination mit fusionsfähigen (Ad CMV F&H) und nicht-fusionsfähigen Vektoren (Ad CMV  $\beta$ Gal) eingesetzt wurden. Darüber hinaus wurden als Kontrolle andere Zellansätze nur mit Ad dl309 mit einer m.o.i. von 100 infiziert.

Um mit diesem Experiment eine mögliche Tumoranwendung nachzustellen, wurde die Infektion unter den Bedingungen einer intratumoralen Injektion durchgeführt. Mit diesem Ziel wurden zuerst nur kleine Ansätze von H1299-Zellen -nämlich 10 000/Zellen pro Loch- mit Ad dl309 in Kombination mit dem Vektor Ad CMV F&H oder Ad CMV  $\beta$ Gal jeweils mit einer m.o.i. von 50 infiziert und drei Stunden im Inkubator geschüttelt. Diese Prozedur versucht den ersten Kontakt zwischen den Viren und dem Stichkanal einer Virusinjektion zu imitieren, d.h., in den ersten Stunden nach einer Injektion werden erst nur die zum Nadelkanal benachbarten Zellen infiziert und dann später neue Partikel aus diesen Zellen freigesetzt. So werden diese Viren die nächste periphere Tumorschicht weiterinfizieren bzw. sich ausbreiten. Eine darauffolgende Zugabe von 200 000 frischen H1299-Zellen auf den zuerst infizierten Zellansatz versucht dieses Phänomen nachzuahmen. Die gesamte Prozedur ist in der Abbildung 5.8 dargestellt. Um den globalen Titer der Virusausbeuten zu bestimmen, wurden die Zellen nach 48, 72 und 96 Stunden geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese auf HER-911-Zellen titriert. So werden auf diesen permissiven Zellen sowohl die Vektoren als auch die replikationsfähigen Viren quantifiziert.

Aus den Ergebnissen dieses Experimentes geht hervor, dass die Replikation der Viren und Vektoren von der Fusion in diesem Koinfektionsmodell nicht beeinträchtigt wird. Die Titer der Kombinationen *Ad CMV F&H + Ad dl309* zeigen, verglichen zu dem Ansatz *Ad CMV  $\beta$ Gal + Ad dl309*, sogar eine leichte Superiorität, die sich nach 96 Stunden besser erkennen lässt. Genauso zeigt sich die Replikation von dl309 allein, aber sein Titer sinkt nach 96 Stunden etwas unter *Ad CMV F&H + Ad dl309* und wenig unter *Ad CMV  $\beta$ Gal + Ad dl309* ab.



**Abb. 5.8: Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation in H1299-Zellen.**

**Koinfektionsmodell von einem replikationsfähigen Adenovirus (*Ad dl 309*) in Kombination mit fusions- und nicht-fusionsfähigen 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren (*Ad CMV F&H* bzw. *Ad CMV βGal*).** Für dieses Experiment wurden am Vortag 10 000 H1299-Zellen/Loch in eine 6 Loch-Platte ausgesät. Die entsprechenden Zellansätze wurden mit Ad dl 309 in Kombination mit Ad CMV F&H oder Ad CMV βGal infiziert. Dabei wurde als Kontrolle ebenfalls ein Ansatz nur mit Ad dl 309 (mo.i. 100) infiziert. In allen Virusansätzen wurde bei jedem Virus eine m.o.i. von 50 verwendet. 6 Stunden nach Beginn der Infektion wurde auf die infizierten Zellen zusätzlich eine Charge von 200.000 H1299-Zellen pipettiert und in DMEM-FCS weiterinkubiert. Um den Titer der Virusausbeuten zu bestimmen, wurden die Zellen nach 48, 72 und 96 Stunden geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese auf HER-911-Zellen titriert.

Auf der Grafik sind die ermittelten Virustiter (Virusausbeute (f.f.u./mL.), y-Achse) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zeit[h], x-Achse) dargestellt.

### 5.3.2 Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem E4-deletierten Virus (*dl 366*) und einem 1<sup>st</sup> Generations-Vektor (*Ad CMV F&H* oder *Ad CMV βGal*) in H1299-Zellen

Bisher ist wenig bekannt über die Molekularbiologie der adenoviralen Replikation im Rahmen einer Synzytienbildung und noch weniger über die Merkmale der adenoviralen Protein-Verteilung innerhalb einer Synzytienstruktur (*Li et al., 2001*).

1<sup>st</sup> Generations-Vektoren tragen eine Deletion der E1-Region ihres Genoms und sind unfähig zur Replikation in normalen Zellen. Im Fall der 2<sup>nd</sup> Generations-Vektoren wurden zusätzliche, ebenfalls essentielle Sequenzen deletiert, die für die Synthese der adenoviralen E4-Produkte kodieren.

Um eine aktive Replikation zu erreichen, benötigen diese 1<sup>st</sup> und 2<sup>nd</sup> Generations-Vektoren entweder eine konstitutive Expression von E1- bzw. E4-Produkten in permissiven Zellen oder eine andere Quelle, die die Synthese dieser Proteine gewährleisten kann, folglich entweder transient transfizierte Plasmide, die unter einem aktiven Promotor diese Produkte kodieren oder andere adenovirale Vektoren, die bei einer Kotransduktion diese Proteine dem anderen Vektor zur Verfügung stellen. Eine Kotransduktion zwischen 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren und

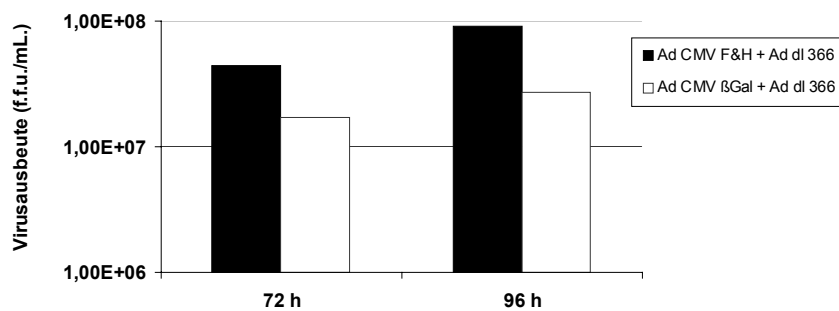
einem E4-deletierten Virus ermöglicht die Replikation von beiden, da beide Vektoren entweder die E1- oder E4-Produkte synthetisieren und so die Replikation ihres Partners komplementieren.

Dieser Ansatz bietet Möglichkeiten zur selektiven Tumorthherapie mit onkolytischen Adenoviren. Auf diese Art können 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren die Synthese von Fusionsproteinen induzieren, so eine hohe Zytotoxizität fördern und gleichzeitig ist möglich, dass tumorselektive, E4-deletierte Vektoren den Umfang dieser Replikation bzw. die Zytolyse nur auf Tumorzellen beschränken.

Darüber, wie die Fusion auf die Replikation dieser Vektoren bei einer Koinfektion wirkt und welche molekulare Folgen sich daraus ergeben könnten, ist bisher noch Vieles unbekannt.

Um die Mechanismen dieser Phänomene zu verstehen, wurde ein Experiment durchgeführt (Abb. 5.9), in welchem zwei Vektoren, die nicht alleine in H1299-Zellen replizieren können, in einem Koinfektionsmodell ihre replikativen Aktivitäten miteinander komplementieren.

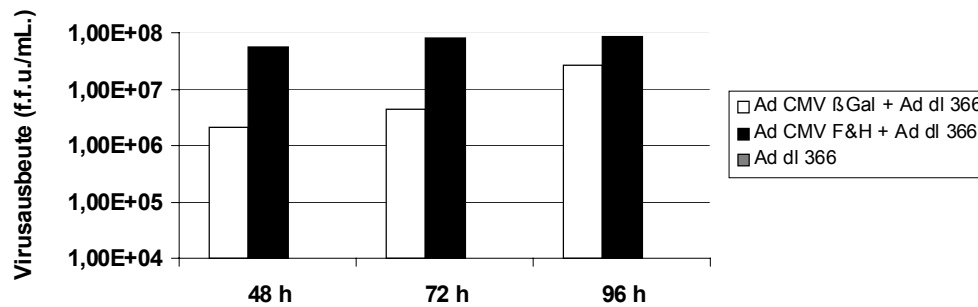
Dementsprechend wurden H1299-Zellen von einem E4-deletierten Vektor namens Ad dl366 in Kombination mit einem 1<sup>st</sup> Generations-Vektor, Ad CMV F&H oder Ad CMV  $\beta$ Gal, transduziert. Für dieses Experiment wurden am Vortag 100 000 H1299-Zellen/Loch auf einer 12 Loch-Platte ausgesät. Für jedes Virus wurde jeweils eine m.o.i. von 0,1 verwendet. Die infizierten Zellen wurden in DMEM-FCS weiter inkubiert. Im Verlauf dieses Experimentes wurden die Zellrasen unter Licht- bzw. UV-Mikroskop beobachtet. Bei dieser Untersuchung wurden Synzytien bzw. infizierte Zellen erkannt. Um den Titer der Virusaussbeuten zu bestimmen, wurden die Zellen nach 72 und 96 Stunden geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese auf HER-911-Zellen titriert.



**Abb. 5.9: Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem 2<sup>nd</sup>. Generations-Vektor (*Ad dl 366*) und einem 1<sup>st</sup>. Generations-Vektor (*Ad CMV F&H* oder *Ad CMV βGal*) in H1299-Zellen.** Für dieses Experiment wurden am Vortag 100 000 H1299-Zellen/Loch auf einer 12 Loch-Platte ausgesät. Die entsprechenden Zellansätze wurden mit *Ad dl 366* in Kombination mit *Ad CMV F&H* oder *Ad CMV βGal* infiziert. Parallel wurden zur Kontrolle Ansätze mit jedem Virus individuell infiziert. Für jedes Virus wurde jeweils eine m.o.i. von 0,1 verwendet. Die infizierten Zellen wurden in DMEM-FCS weiter inkubiert. Um den Titer der Virusaussbeuten zu bestimmen, wurden die Zellen nach 72 und 96 Stunden geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese auf HER-911-Zellen titriert. Auf der Grafik sind die ermittelten Virustiter (Virusaussbeute (f.f.u./mL.), y-Achse) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zeit[h], x-Achse) dargestellt. A Virusreplikation von *Ad dl 366* in Kombination mit *Ad CMV F&H* (■) oder *Ad CMV βGal* (□). In dieser Abbildung wurde die gesamte Virusmenge gezeigt. Die Ausbeute der Kontrollansätze betrug ein Titer niedriger als  $1,0 \times 10^3$ .

Nach Betrachtung der erhaltenen Virusaussbeuten fällt hier auf, dass die Replikation nach Koinfektion mit *Ad CMV F&H* besser ist als jene mit *Ad CMV βGal*, sowohl 72- als auch 96-Stunden p.i.. Dies spricht dafür, dass die Fusion eine fördernde Rolle zur Vermehrung von Vektoren spielen könnte.

Um dies in einem anderen Modell zu bestätigen, wurde ein erneutes Experiment durchgeführt, in welchem der gleiche Versuchsaufbau angewendet wurde. Dementsprechend, und wie in Abb. 5.10 erklärt, wurden am Vortag 10 000 H1299-Zellen/Loch auf eine 6 Loch-Platte ausgesät. Die entsprechenden Zellansätze wurden mit *Ad dl 366* in Kombination mit *Ad CMV F&H* oder *Ad CMV βGal* infiziert. Dabei wurde als Kontrolle ebenfalls ein Ansatz nur mit *Ad dl 366* infiziert. In allen Virusansätzen wurde von jedem Virus eine m.o.i.= 50 verwendet. 6 Stunden nach Infektionsbeginn wurde auf die infizierten Zellen zusätzlich eine Charge von 200.000 H1299-Zellen pipettiert und in DMEM-FCS weiterinkubiert. Um den Titer der Virusaussbeuten zu bestimmen, wurden die Zellen nach 48, 72 und 96 Stunden geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese auf HER-911-Zellen titriert.



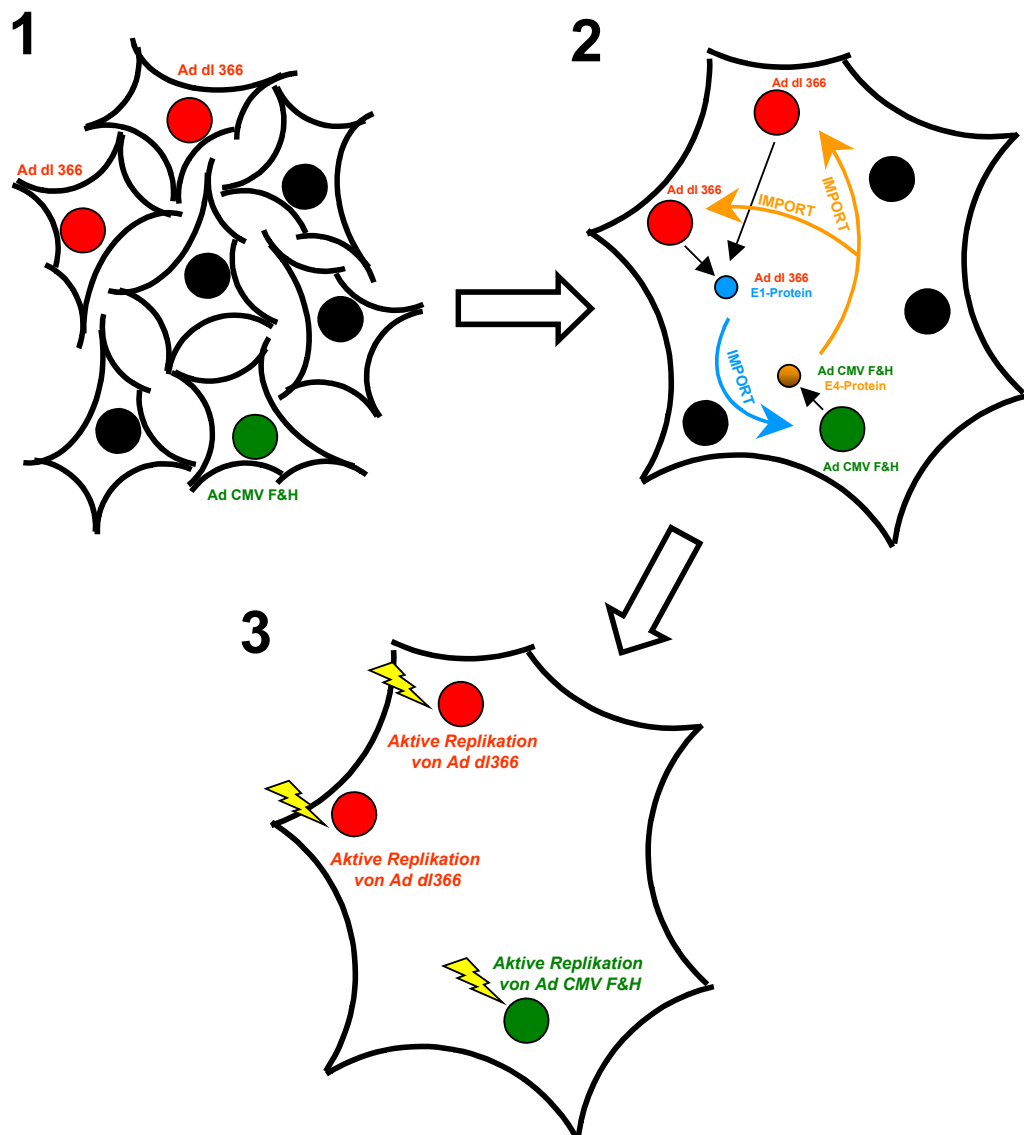
**Abb. 5.10:** Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem 2<sup>nd.</sup> Generations-Vektor (*Ad dl 366*) und einem 1<sup>st.</sup> Generations-Vektor (*Ad CMV F&H* oder *Ad CMV βGal*) in *H1299*-Zellen. Für dieses Experiment wurden am Vortag 10 000 *H1299*-Zellen/Loch auf eine 6 Loch-Platte ausgesät. Die entsprechenden Zellansätze wurden mit *Ad dl 366* in Kombination mit *Ad CMV F&H* oder *Ad CMV βGal* infiziert. Dabei wurde als Kontrolle ebenfalls ein Ansatz nur mit *Ad dl 366* infiziert. In allen Virusansätzen wurde von jedem Virus eine m.o.i.= 50 verwendet. 6 Stunden nach Infektionsbeginn wurde auf die infizierten Zellen zusätzlich eine Charge von 200.000 *H1299*-Zellen pipettiert und in DMEM-FCS weiterinkubiert. Um den Titer der Virusausbeuten zu bestimmen, wurden die Zellen nach 48, 72 und 96 Stunden geerntet, eine Virussuspension hergestellt und diese auf *HER-911*-Zellen titriert. Auf der Grafik sind die ermittelten Virustiter (Virusausbeute (f.f.u./mL.), y-Achse) zu verschiedenen Zeitpunkten (Zeit[h], x-Achse) dargestellt. A Virusreplikation von *Ad dl 366* in Kombination mit *Ad CMV βGal* (□), *Ad CMV F&H* (■) oder allein (■). In dieser Abbildung wurde die gesamte Virusmenge gezeigt. Die Ausbeute der *Ad dl 366*-Kontrollansätze betrug ein Titer niedriger als  $1,0 \times 10^3$ .

Die Replikationsfähigkeit der Koinfektion mit *Ad CMV F&H* und *Ad dl366* Vektoren bleibt in den drei Zeitpunkten dieser Untersuchung deutlich höher als jene, die mit *Ad CMV βGal* und *Ad dl366* durchgeführt wurde. Diese ergab nach 48- und 72-Stunden p.i. einen Unterschied im Replikationsverhalten von *Ad CMV F&H* + *Ad dl366* gegenüber *Ad CMV βGal* + *Ad dl366* von bis zu anderthalb Log-Stufen. Nach 96 Stunden steht die Replikation der ersten Viren eine halbe Log-Stufe über den zweiten Viren. Diese Tatsache lässt sich damit erklären, dass die Komplementation zwischen 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren und E4-deletierten Viren von der Fusion gefördert wird.

Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich die Hypothese ableiten, dass adenovirale Gen-Produkte innerhalb einer Synzytienbildung in verschiedene Kerne importiert werden können. Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass Zellen, die initial nur von *Ad dl 366* infiziert wurden, danach durch die Fusion mit den benachbarten Zellen in ein Synzytium inkorporiert werden. Bei dieser Ausbreitung der Synzytiumbildung werden die Strukturen von verschiedenen infizierten Zellen (bzw. Kernen) in einem gemeinsamen Zytoplasma zusammengebracht. Folglich würden adenovirale Proteine (z.B. E1 bzw. E4-Produkte), die von einem Vektor nicht synthetisiert werden können, von einem anderen Vektor in dem „Synzytiumpasma“ zur Verfügung gestellt und demzufolge von allen Kernen des Synzytiums importiert. So würden infizierte *Ad dl 366* Kerne nach der Inkorporation in ein Synzytium die E4-Proteine importieren können, beziehungsweise die Replikation von den Vektoren

vorantreiben. Genauso könnten E1-Proteine von den anfänglich Ad CMV F&H infizierten Kernen importiert werden. Auf diese Art und Weise könnte die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion von der Fusion verbessert werden. Dieses Modell ist in der Abbildung 5.11 dargestellt.

Die Komplementation Ad dl 366 und Ad CMV  $\beta$ Gal wird von diesem Mechanismus nicht profitieren. Die Replikation wird nur ermöglicht, falls die zwei Vektoren gleichzeitig die gleiche Zelle infizieren und auf diese Art eine Komplementierung erreichen.



**Abb. 5.11: Beitrag der Fusion zur Verbesserung der Replikationsfähigkeit einer komplementierenden Infektion zwischen Ad dl 366 und Ad CMV F&H in nicht-permissiven Zellen.** Dieser Abbildung zeigt eine theoretische Darstellung möglicher Ereignisse, die sich bei der Replikation von Ad dl366 + Ad CMV F&H entwickeln könnten.

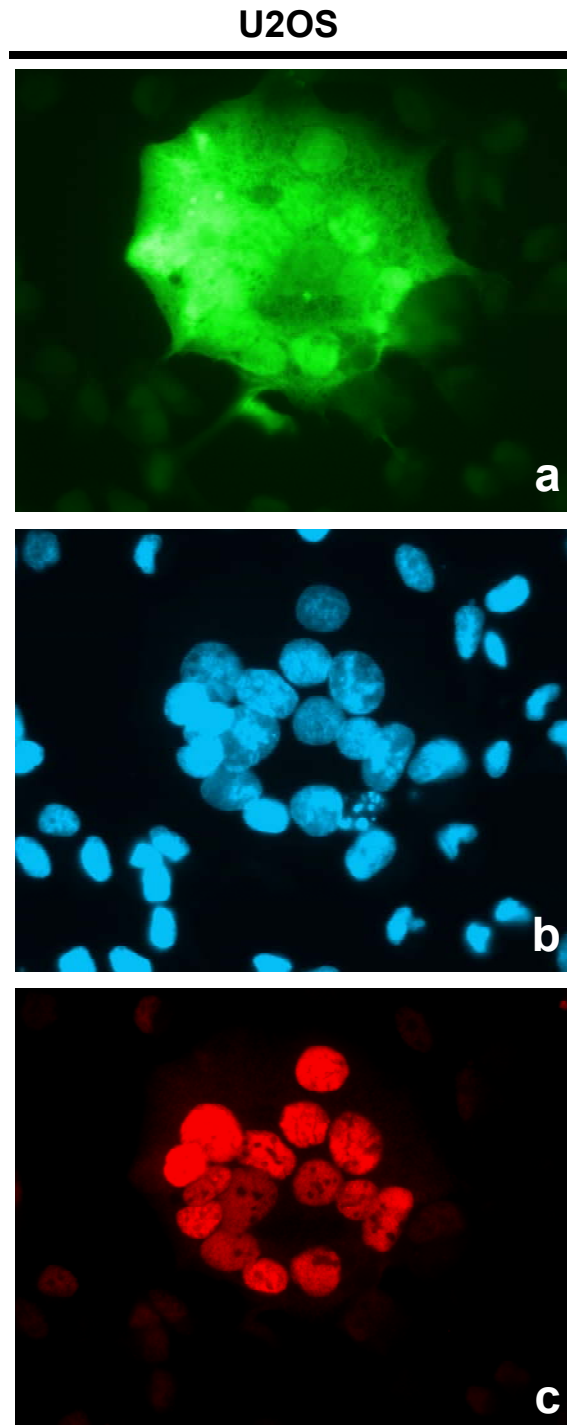
**1** Ein Zellrasen wird gleichzeitig von beiden Vektoren im Rahmen einer Koinfektion transduziert. Viele Zellen werden entweder von Ad CMV F&H (●) oder Ad dl 366 (●) erreicht, aber sie werden nicht replizieren können, weil es sich nur um nicht-replikationsfähige Vektoren handelt. **2** Die mit Ad CMV F&H infizierte Zelle wird nach der Synthese von Fusionsproteinen die Benachbarten in einem Synzytium einbeziehen. Innerhalb des Synzytiums werden adenovirale Proteine beider Vektoren in dem gemeinsamen Zytoplasma synthetisiert und in ihre infizierten Kerne zur Komplementierung der entsprechenden Replikationen importiert. **3** Folglich wird eine aktive Replikation auf diese Art stattfinden können.



Um die komplementierende Replikation der 1<sup>st</sup>-Generations-Vektoren und Ad dl 366 in Synzytien besser zu verstehen, wurde die synergistische Aktivität von E1A und E4 mit der Anwendung der Immunfluoreszenz untersucht. So wurde nach direkten und indirekten Zeichen gesucht, die auf den Import beider Proteine in ein Synzytium hinweisen.

In dem folgenden Experiment (Abb. 5.12) wurden U2OS-Zellen auf Kammer-Objektträger ausgesät. Diese wurden gleichzeitig mit Ad dl 366 mit einer m.o.i. von 2 und mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert. Auf diese Art wurden alle Zellen dieses Rasen mit Ad dl 366 gleichmäßig infiziert. Dieses mit Ad dl 366-transduzierte Substrat wird mit einer sehr niedrigen m.o.i. von Ad CMV F&H zusätzlich infiziert. Somit werden wenige Synzytien auftreten, die auf dem Zellrasen untersucht werden können. U2OS-Zellen sind zur Replikation von beiden Vektoren nicht permissiv und auf Grund ihrer Größe für eine Infektion mit fusionsfähigen Vektoren und darauffolgende Fotoaufnahme besonders geeignet. Drei Stunden später wurden die Infektionsansätze aus den Zellen abgesaugt und schließlich 1 ml DMEM-FCS dazugegeben. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C 48 Stunden inkubiert. Danach wurden Kammer-Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine Färbung für IF gegen das adenovirale E1A-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Synzytien wurden auf dem Zellrasen unter UV-Mikroskop gesucht und mit geeigneten Filtern für GFP, DAPI und dem adenoviralen E1A-Protein fotografiert.

Nach der Beobachtung der verschiedenen Synzytien, die auf dem Zellrasen standen, konnten Bilder aufgenommen werden, auf welchen die E1A-Färbung von allen Synzytien-Kernen ein deutliches Signal ergab (Abb. 5.12) Dabei ist ebenfalls eine diffuse E1A-Markierung im Zytoplasma zu beobachten. Die danebenliegenden Zellen, die in der Synzytiumbildung nicht beteiligt sind, zeigen ein zwar erkennbares aber viel schwächeres E1A-Signal in ihren Kernen.



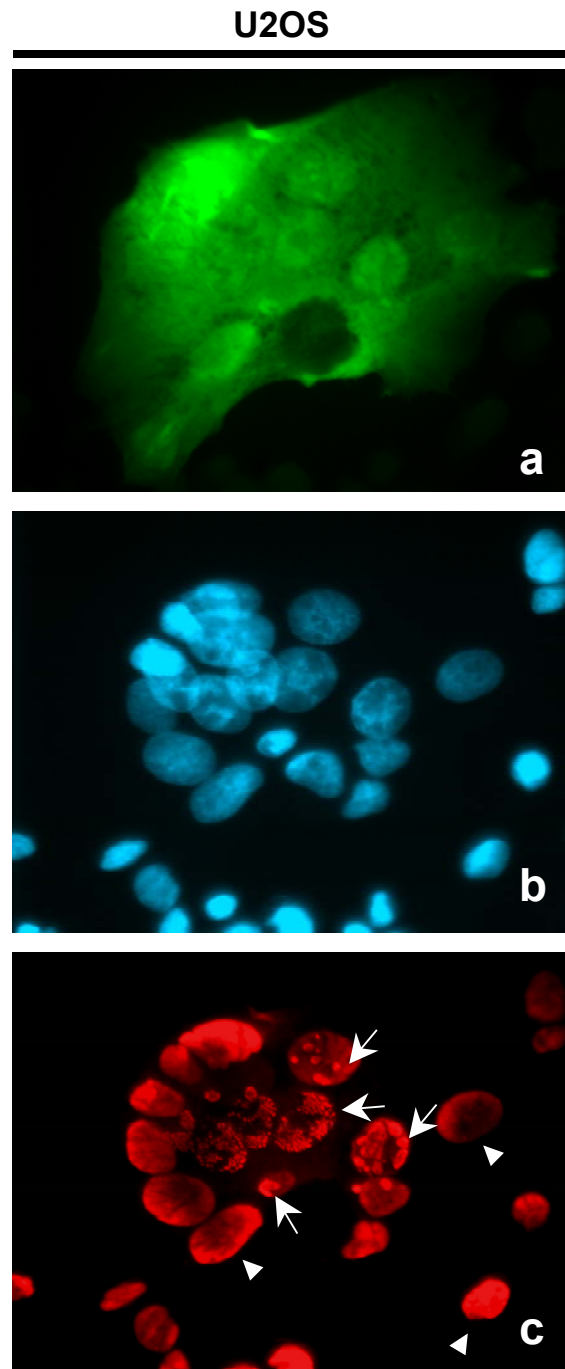
**Abb. 5.12: Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem 2<sup>nd</sup>. Generations-Vektor (*Ad dl 366*) und einem 1<sup>st</sup>. Generations-Vektor (*Ad CMV F&H*) in U2OS-Zellen.** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von U2OS-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät. Diese wurden gleichzeitig mit *Ad dl 366* mit einer m.o.i. von 2 und mit *Ad CMV F&H* mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert. Drei Stunden später wurden die Infektionsansätze aus den Zellen abgesaugt und schließlich 1 mL DMEM-FCS dazugegeben. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C 48 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine Färbung für IF gegen das adenovirale E1A-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Synzytien wurden auf dem Zellrasen unter UV-Mikroskop gesucht und mit geeigneten Filtern für GFP (a), DAPI (b) und das adenovirale E1A-Protein (Alexa 588) (c) fotografiert. Die Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 64X aufgenommen.

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse fällt auf, dass die Synthese von E1A im Rahmen der Fusion deutlich verstärkt wird. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Synthese der E1A-Produkte von der Verteilung der synthetisierten E4-Produkte gefördert wird und die E1A-Proteine in allen Kernen eines Synzytiums importiert werden (Proteine werden nur im Zytoplasma synthetisiert). Hier ist dennoch nicht klar, ob das starke E1A-Signal an der individuellen Transkription in allen Kernen liegt oder diese Proteine ausschließlich in einem einzigen Kern transkribiert (infizierter Ad CMV F&H-Kern) und nach ihrer Synthese überall importiert werden. Die Lösung dieses Problems setzt das Verständnis für den Mechanismus der E4-Synthese bzw. E4-Kernimportierung voraus.

Ein Zeichen der adenoviralen DNA-Replikation besteht in der Bildung von E2A(DBP)-„Replikationszentren“ in der Immunfluoreszenz. Diese Einlagerungen von E2A (DBP) bzw. E2A(DBP)-DNA-Komplexen stellen sich in der Immunfluoreszenz als kleine, leuchtende „Sommersprossen“ dar, die im Kern auftreten. Da sie auch die replizierende Virus-DNA enthalten, werden diese Strukturen „Replikationszentren“ (RZ) genannt (Abb. 5.13 c, *Pfeile*). In der ersten Phase der Adenovirusinfektion und vor Beginn der DNA-Replikation werden diese Proteine in den Kern importiert und sind zunächst homogen verteilt. Entsprechend findet man ein homogenes Signal bei der Immunfärbung (Abb. 5.13 c, *kleine Dreiecke*). Hat die DNA-Replikation begonnen, werden diese Proteine re-lokalisiert und das Muster der „Replikationszentren“ (RZ) bilden.

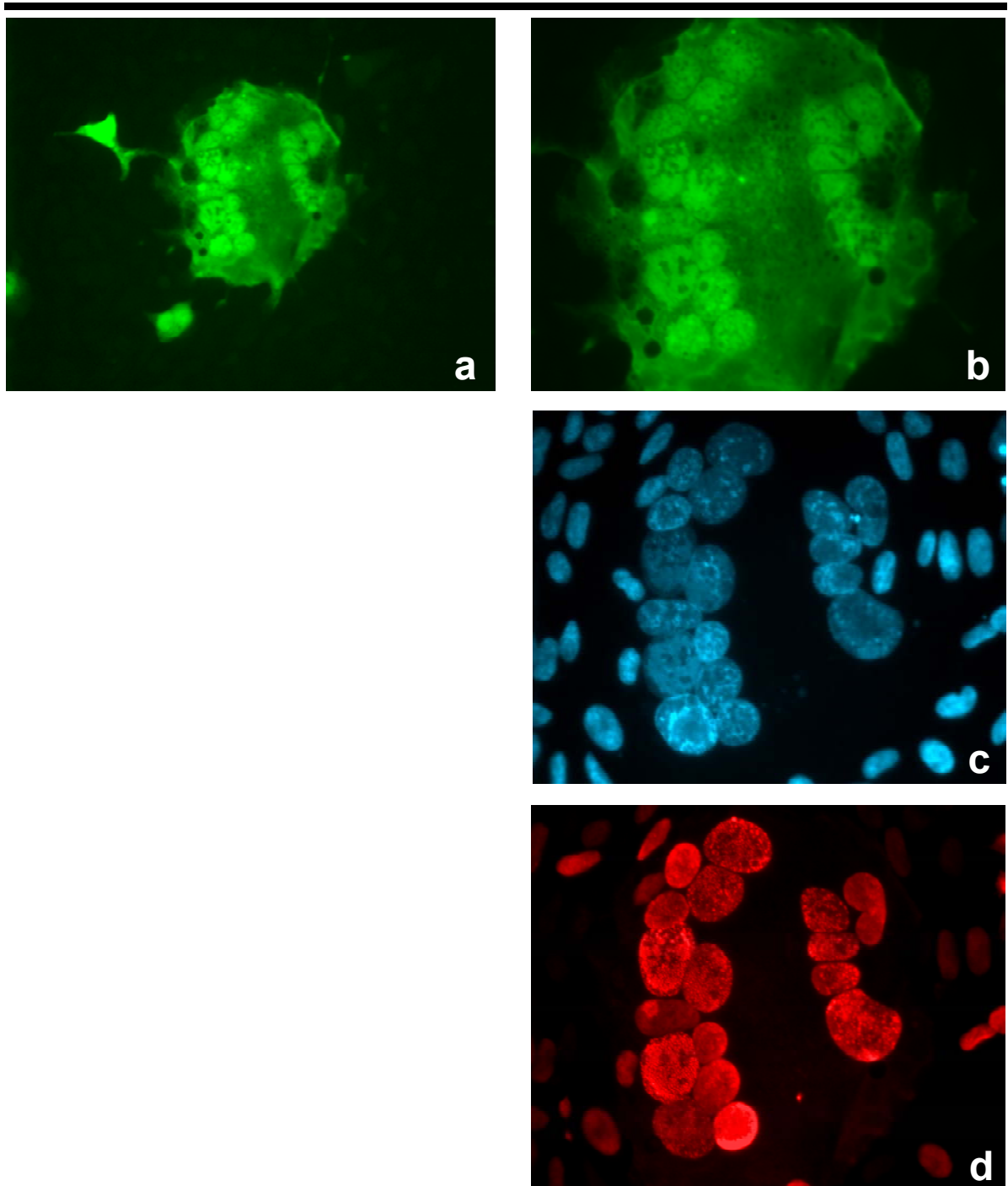
Um die in Synzytien komplementierende Replikation der fusionsfähigen 1<sup>st</sup>Generations-Vektoren und Ad dl 366 zu untersuchen, wurde unter UV-Mikroskop nach Auftreten von RZ in den beteiligten Kernen der Synzytien gesucht. U2OS-Zellansätze und 911-Zellansätze wurden nach dem gleichen Schema wie oben mit Ad dl366 und Ad CMV F&H infiziert. Dieses Mal wurden die Zellen nach 48 Stunden fixiert und schließlich eine Immunfärbung gegen E2A(DBP) durchgeführt. In der Abb. 5.13 sind diese Replikationszentren nach 48 Stunden in mehr als 8 von 20 intrasynzytiellen Kernen deutlich zu erkennen. Die danebenliegenden Kerne, die nicht zum Synzytium gehören, zeigen zwar ein homogenes Signal, aber keine Replikationszentren.

Desgleichen zeigen jene 911-Zellenansätze, die bei einem parallelen Experiment unter gleichen Bedingungen infiziert wurden, eine große Anzahl von intrasynzytiellen Kernen mit Replikationszentren (Abb. 5.14). Die danebenliegenden Zellkerne außerhalb des Synzytiums zeigen lediglich ein diffuses, homogenes E2A(DBP)-Signal (Abb. 5.14).



**Abb. 5.13: Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem 2<sup>nd</sup>. Generations-Vektor (*Ad dl 366*) und einem 1<sup>st</sup>. Generations-Vektor (*Ad CMV F&H*) in U2OS-Zellen.** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von U2OS-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät. Diese wurden gleichzeitig mit *Ad dl 366* mit einer m.o.i. von 2 und mit *Ad CMV F&H* mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert. Drei Stunden später wurden die Infektionsansätze aus den Zellen abgesaugt und schließlich 1 mL DMEM-FCS dazugegeben. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C 48 Stunden inkubiert. Danach wurden Kammer-Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine Färbung für IF gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Synzytien wurden auf dem Zellrasen unter UV-Mikroskop gesucht und mit geeigneten Filtern für GFP (**a**), DAPI (**b**) und das adenovirale E2A(DBP)-Protein (**c**) fotografiert. Auf dem Bild **c** weisen Pfeile und Dreiecke auf mehrere Replikationszentren bzw. homogene E2A-Markierungen hin.

## HER-911



**Abb. 5.14: Einfluss der Fusion auf die adenovirale Replikation im Rahmen einer komplementierenden Infektion zwischen einem 2<sup>nd</sup>. Generations-Vektor (*Ad dl 366*) und einem 1<sup>st</sup>. Generations-Vektor (*Ad CMV F&H*) in HER-911-Zellen.** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät. Diese wurden gleichzeitig mit *Ad dl 366* mit einer m.o.i. von 2 und mit *Ad CMV F&H* mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert. Drei Stunden später wurden die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich 1 mL DMEM-FCS dazugegeben. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C 48 Stunden inkubiert. Danach wurden Kammer-Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Synzytien wurden auf dem Zellrasen unter UV-Mikroskop gesucht und mit geeigneten Filtern für GFP (40X (a) und 64X (b)), DAPI (c) und das adenovirale E2A(DBP)-Protein (d) fotografiert.

Innerhalb der Synzytien gibt es jedoch Kerne, die nur ein diffuses E2A(DBP)-Signal enthalten und keine RZ zeigen. Eine mögliche Begründung kann in der allmählichen Bildung der Synzytien liegen, d.h., bei dem Wachstum dieser Synzytien werden progressiv neue Zellen inkorporiert. Diese neu inkorporierten Kerne werden den DNA-Replikationsvorgang zu einem späteren Zeitpunkt starten.

#### **5.4 Einfluss der Fusion auf die Molekularbiologie adenoviraler Vektoren**

Replikationsfähige Adenoviren eignen sich unter bestimmten Voraussetzungen zur Therapie solider Tumoren. Wie in der Einleitung schon erörtert, wurden diese onkolytischen Adenoviren in klinischen Studien direkt in die Tumoren injiziert. Die Ausbreitung dieser Adenoviren führt zur Nekrose und Zerstörung des Tumorgewebes. Zur Verbesserung dieses therapeutischen Ansatzes stehen zwei Ziele im Vordergrund. Erstens soll eine selektive Replikation ausschließlich in Tumorzellen erfolgen und so ein Befall des umliegenden Normalgewebes verhindert werden. Zweitens ist es notwendig, die Zytotoxizität dieser Viren zu optimieren, damit möglichst viele Tumorzellen zerstört werden können.

Die Fusion stellt eine sehr gute Strategie dar, um die Zytotoxizität zu verstärken. Dessen ungeachtet sollte dies die normale Biologie der Adenovirus-Replikation nicht alterieren. Um dies nachweisen zu können, wurde die Adenovirus-Replikation und die adenovirale Transgen-Expression auf verschiedenen molekularen Ebenen untersucht.

##### **5.4.1 Einfluss der Fusion auf die Expression adenoviraler Gene**

Um dies zu untersuchen, wurde die Expression von frühen, spätfrühen und späten adenoviralen Produkten im Kontext einer Infektion mit fusionsfähigen Adenoviren durch Western Blot evaluiert. Daneben wurde ein anderer, nicht-fusionsfähiger Vektor zum Vergleich verwendet, nämlich Ad CMV  $\beta$ Gal.

Zur Abschätzung des Fusionseinflusses auf die Proteinsynthese von adenoviralen 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren, wurden HER-911-Zellansätze mit Ad CMVF&H oder mit Ad CMV  $\beta$ Gal infiziert. Die m.o.i. der entsprechenden Virusansätze betrug jeweils 0,1. Die infizierten Zellen wurden stets in normalem DMEM-FCS weiter inkubiert. Die Zellen wurden nach 48-Stunden geerntet, mit RIPA lysiert und schließlich mit Laemmli-Puffer versetzt. Äquivalente Volumina von Ad CMV F&H- und Ad CMV  $\beta$ Gal-infizierten Zelllysaten wurden zur Abschätzung der adenoviralen Proteinsynthese in SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt.

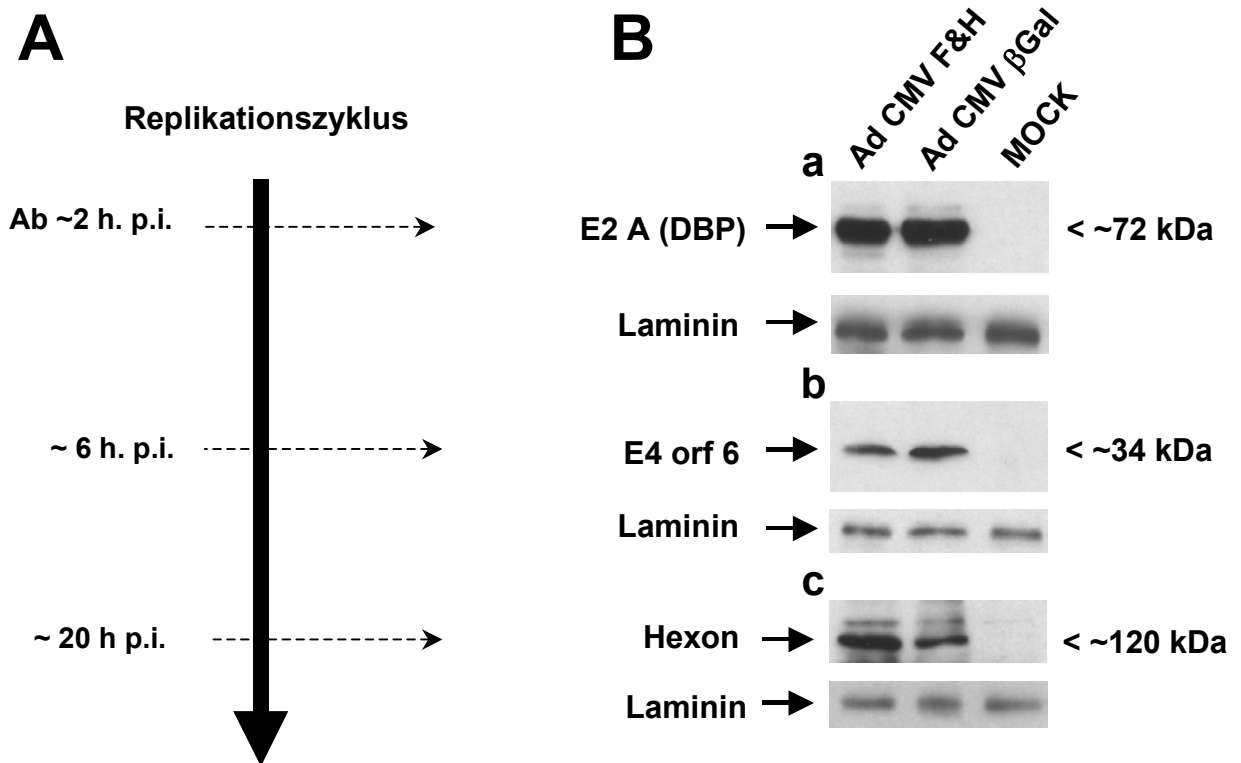
Die Blots wurden dann mit Antikörpern gegen frühe (E2A(DBP)), spätfrühe E4/34kD (E4orf6) und späte (Hexon) adenovirale Proteine gefärbt. Anschließend erfolgte zur Kontrolle des Blots und der aufgetragenen Proteinmenge in jedem Fall eine Färbung gegen das zelluläre Lamin-Protein.

In der Abbildung 5.15 wurde eine graphische Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Synthese (Abb. 5.15A) und der Färbung der entsprechenden Proteine (Abb. 5.15B) dargestellt. Hier lassen sich keine Unterschiede zwischen beiden E2A(DBP)-Expressionen erkennen. Die anschließende Färbung gegen Lamin kann bestätigen, dass die Lysatmengen auf das Gel gleichmäßig aufgetragen wurden.

Ebenfalls lassen sich keine erheblichen Unterschiede bei der Betrachtung der E4/34kD-Protein-Expression zwischen Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal ausmachen. Das E4/34kD-Protein wird im „Offenen Leserahmen 6“ (orf 6) transkribiert, deswegen ist dies auch als „E4orf6“ bekannt. Die Transkription von E4orf6 findet in der ersten Phase der Adenovirus-Replikation statt, jedoch kurze Zeit später als die anderen frühen Proteine. Dementsprechend wird E4orf6 als ein „spätfrühes“ Protein bezeichnet.

Um den Einfluss der Fusion auf die Expression bzw. Synthese von späten Proteinen zu untersuchen, wurde eine Blot-Färbung gegen ein adenovirales spätes Protein durchgeführt. Die späten Virusproteine sind fast ausnahmslos Strukturproteine und werden nach der Aktivierung des adenoviralen MLP-Promoter (*Major Late Promoter*) erst in der letzten Phase des Replikationszyklus transkribiert. Adenovirale Kapsomere werden Hexone genannt, von welchen zwölf eine Kapsidseitenfläche bilden. Ein Hexon entspricht einem Trimer des viralen *Hexon-Proteins* (120kD). Das Hexon-Protein induziert die Bildung von gruppenspezifischen Antikörpern. In diesem Experiment zeigten die Hexon-Proteinmengen beider Vektoren nach dem Western Blot keine großen Unterschiede.

Insgesamt lassen sich bei der Betrachtung der unterschiedlichen Parameter keine bedeutenden Unterschiede zwischen fusions- und nicht-fusionsfähigen Vektoren ausmachen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Fusion eine beeinträchtigende Wirkung auf die Expression und Synthese adenoviraler Proteine hat.



**Abb. 5.15: Western Blot-Analyse zur Abschätzung des Fusionseinflusses auf die Proteinsynthese von adenoviralen 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren.** HER-911-Zellen wurden mit Ad CMVF&H oder mit Ad CMV βGal infiziert. Die m.o.i. der entsprechenden Virusansätze betrug jeweils 0,1. Die infizierten Zellen wurden stets in normalem DMEM-FCS weiter inkubiert. Die Zellen wurden nach 48-Stunden geerntet und lysiert. Äquivalente Volumina von Ad CMV F&H- und Ad CMV βGal-infizierten Zelllysaten wurden zur Abschätzung der adenoviralen Proteinsynthese in SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt. Die Blots wurden dann mit Antikörpern gegen frühe, spätfrühe und späte adenovirale Proteine gefärbt. **A** Schematische Darstellung eines adenoviralen Replikationszyklus. Hier wurde der Verlauf der Adenovirusreplikation auf einer Zeitleiste ( nach unten gerichtet ) dargestellt, wobei der Anfang und das Ende eines Zyklus am „Schwanz“ bzw. an der Spitze dieses Pfeils stehen. Darüber hinaus werden dazu horizontal versenkende Pfeile (---->) gezeigt, die die verschiedenen Zeitpunkte des Replikationsverlaufs mit den entsprechend geblotteten Proteinen der **B**-Illustration in Verbindung bringen. **B** Färbungen gegen das frühe E2A(DBP)-Protein (**a**), das spätfrühe E4orf6-Protein (**b**) und das späte (strukturelle) Hexon-Protein (**c**). Anschließend erfolgte zur Kontrolle des Blots und der Proteinmenge in jedem Fall eine Färbung gegen das zelluläre Laminin-Protein.



#### 5.4.2 Einfluss der Fusion auf die Transgen-Expression adenoviraler Vektoren

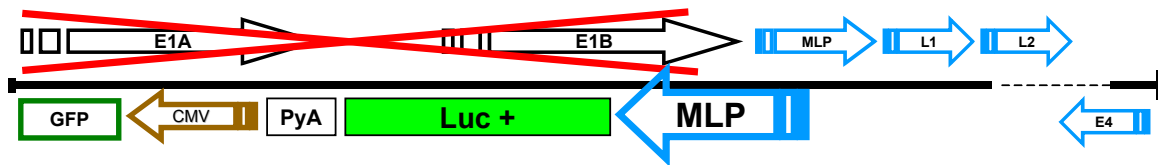
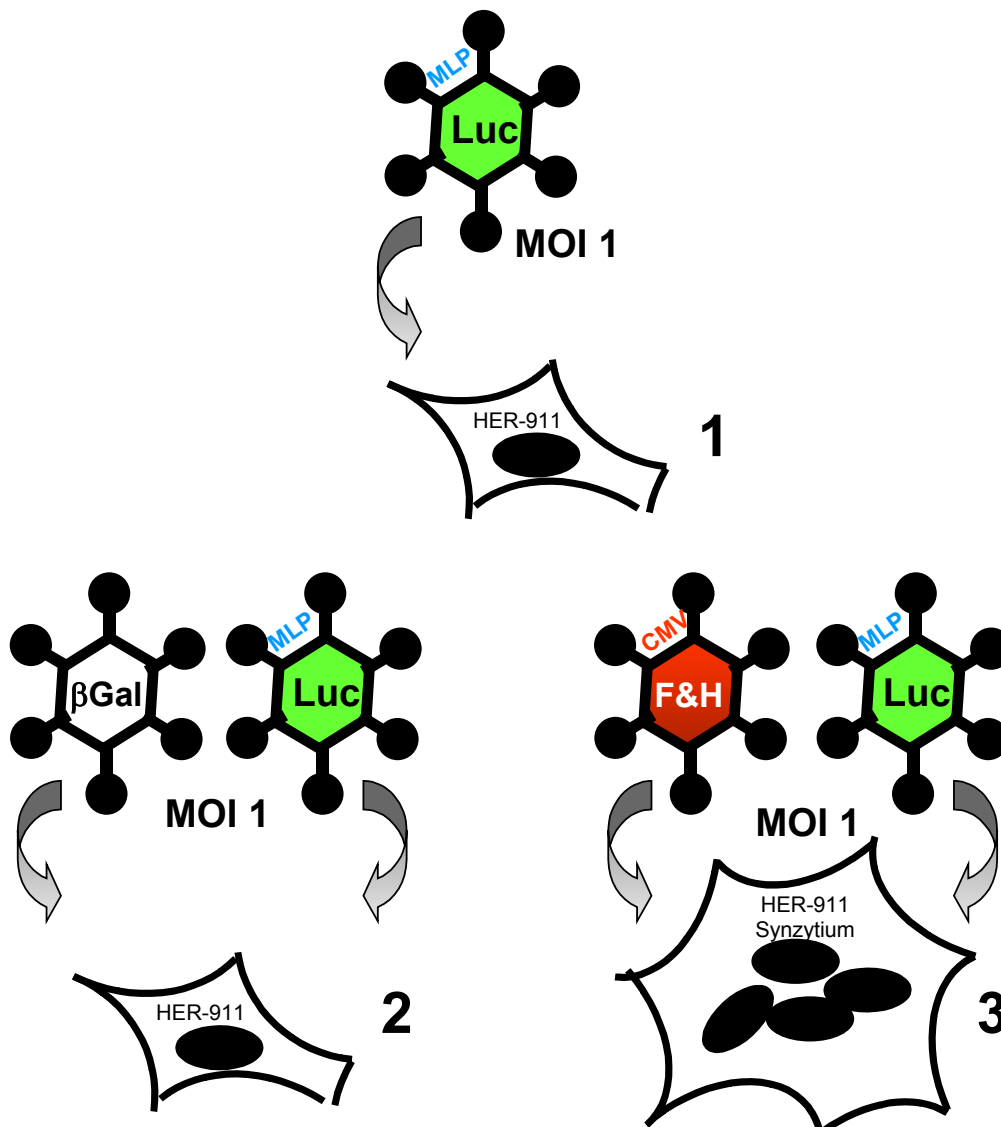
Wie hier bereits ausgeschlossen wurde, kann die Fusion die Expression adenoviraler Proteine während des Replikationszyklus nicht stören, d.h. Adenoviren synthetisieren im Rahmen einer Synzytienbildung ihre eigenen Gen-Produkte ohne störende Einflüsse.

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss der Fusion auf die Expression anderer, nicht-adenoviraler Gen-Produkte untersucht.

Rekombinante Adenoviren tragen in ihrem Genom Sequenzen zur Expression fremder Produkte, die im Verlauf der Virusreplikation mitexprimiert werden. Auf Grund dessen wurde die Expression dieser Produkte als „Transgen-Expression“ bezeichnet. Die Fusionsproteine, die in den Vektoren Ad CMV F&H und Ad MLP F&H kloniert wurden, sind tatsächlich *Transgene*, die zur Verbesserung der Zytotoxizität eingesetzt wurden.

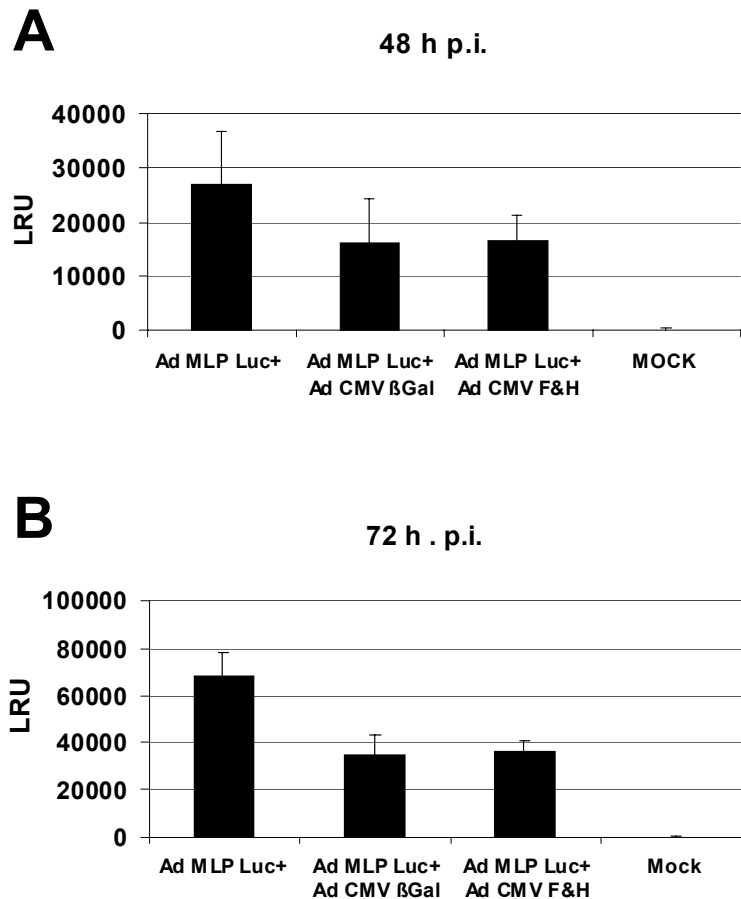
Um den Einfluss der Fusion auf die Transgen-Expression zu untersuchen, wurde ein 1<sup>st</sup> Generations-Vektor verwendet, der in der deletierten E1-Region Sequenzen zur Expression von Luziferase enthält. Die Luziferase-Expression erfolgt unter Stimulierung eines klonierten MLP-Promoters von Adenoviren (Abb. 5.16 A). Auf diese Art wurde ein Vektor konstruiert –Ad MLP Luc<sup>+</sup>–, der die Funktion eines Reporter-Virus erfüllt. Seine Transgen-Expression, nämlich die Luziferase-Aktivität, wird hier im Rahmen der Fusion untersucht.

Ein Experiment wurde durchgeführt, in welchem dieses Reporter-Virus allein oder in Kombination mit fusions- und nicht-fusionsfähigen adenoviralen Vektoren eingesetzt wurde. Für diesen Versuch wurden am Vortag 100 000 HER-911-Zellen/Loch auf eine 12 Loch-Platte ausgesät. Die Zellansätze wurden mit dem 1<sup>st</sup>. Generations-Vektor Ad MLP Luc<sup>+</sup> entweder allein oder in Kombination mit Ad CMV βGal bzw. Ad CMV F&H infiziert (Abb. 5.16 B). Dabei wurde ein uninfizierter Ansatz in diesem Experiment als Kontrolle (Mock) verwendet. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit geeignetem Lyse-Puffer behandelt, ein Zelllysate hergestellt und schließlich die Luziferase-Aktivität im Luminometer gemessen. Parallel wurden die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Lysate dafür verwendet, die Luziferase-Aktivität zu normieren. Die ermittelten Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

**A****B**

**Abb. 5.16:** **A** Struktur des Ad MLP Luc<sup>+</sup> 1<sup>st</sup> Generations-Vektors. Die Sequenzen zur Expression von Luziferase (Luc<sup>+</sup>) stehen unter der Kontrolle eines MLP-Promoters (MLP). **B** Experiment zur Abschätzung des Einflusses der Fusion auf die Transgen-Expression des Ad MLP Luc<sup>+</sup>. HER-911-Zellen wurden mit dem Reporter-Virus infiziert, entweder allein **(1)** oder in Kombination mit einem nicht-fusionsfähigen Vektor (Ad CMV βGal) **(2)** bzw. einem fusionsfähigen Vektor (Ad CMV F&H) **(3)**. Zur Infektion der HER-911-Zellansätze wurde bei den Vektoren jeweils eine m.o.i. von 1 verwendet.

Ergebnisse dieses Experimentes finden sich auf der Abbildung 5.17



**Abb. 5.17: Luziferase-assay zur Abschätzung des Einflusses der Fusion auf die Transgen-Expression eines Luziferase-Reportervirus, *Ad MLP Luc<sup>+</sup>*.** Für diesen Versuch wurden am Vortag 100 000 HER-911-Zellen/Loch auf eine 12 Loch-Platte ausgesät. Die Zellansätze wurden mit dem 1<sup>st</sup>. Generations-Vektor *Ad MLP Luc<sup>+</sup>* entweder allein oder in Kombination mit *Ad CMV βGal* bzw. *Ad CMV F&H* infiziert. Dabei wurde ein uninfizierter Ansatz in diesem Experiment als Kontrolle (Mock) konzipiert. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit geeignetem Lyse-Puffer behandelt, ein Zelllysate hergestellt und schließlich die Luziferase-Aktivität im Luminometer gemessen. Parallel wurden die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Lysate dafür bestimmt, die reale Luziferase-Aktivität zu kalkulieren. Auf der Grafik sind die ermittelten Luziferase-Aktivitäten (LRU (*Luciferase Relative Units*), y-Achse) zu verschiedenen Infektionsansätzen dargestellt. **A** Werte nach 48- und **B** 72-Stunden p.i..

In diesem Experiment zeigt die Luziferase-Aktivität unterschiedliche Werte, je nachdem ob der Reporter-Vektor allein oder in Kombination mit anderen Vektoren eingesetzt wurde. Sowohl 48- als auch 72-Stunden p.i. ergeben die mit *Ad MLP Luc<sup>+</sup>* infizierten Zellen, verglichen mit den anderen koinfizierten Ansätzen, eine deutlich höher Luziferase-Aktivität. Dies ist zu erwarten, da die Zellen in diesem Fall nur mit dem Reporter-Vektor mit einer m.o.i. von 1 transduziert wurden, wobei die anderen Zellansätzen mit einer Kombination von zwei Vektoren (*Ad MLP Luc<sup>+</sup>* + *Ad CMV F&H* bzw. + *Ad CMV βGal*) infiziert wurden. So betrug die Transduktion eine gesamte m.o.i. von 2, was eine Ursache für die Zerstörung

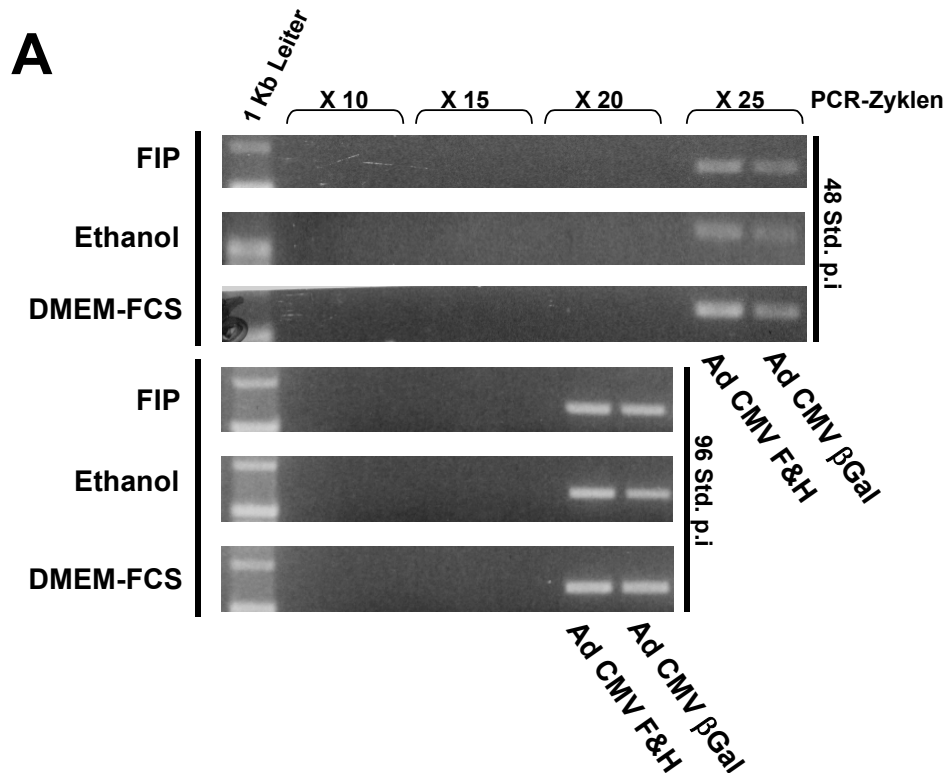
der Zellen in kürzerer Zeit und dadurch niedrigere Luziferase-Expression darstellt. Die Luziferase-Aktivität bei den Koinfektions-Ansätzen zeigt bei Vergleichen jedoch keine großen Unterschiede in ihren Werten, weder 48- oder 72-Stunden p.i..

Die Transgen-Expression von Luziferase wird im Rahmen der Fusion nicht gestört.

#### **5.4.3 Einfluss der Fusion auf die DNA-Replikation adenoviraler Vektoren**

Um den Einfluss der Fusion auf die DNA-Replikation untersuchen zu können, wurde eine semi-quantitative PCR zur Bewertung der während der Replikation entstehenden DNA-Mengen durchgeführt. Dementsprechend wurden mehrere Ansätze HER-911-Zellen entweder mit Ad CMV F&H oder Ad CMV  $\beta$ Gal bei einer m.o.i von 0,1 infiziert. Diese wurden in verschiedenen DMEM-FCS-Zellmedien inkubiert, die Ethanol in einer Konzentration von 1,7mM enthielten, mit oder ohne Zusatz von FIP (Endkonzentration= 100 $\mu$ M). Auf diese Art wurde in den beschriebenen Ansätzen das Auftreten der Fusion mit dem fusionsinhibierenden Peptid gehemmt. Dabei wurden weitere Ansätze mit normalem DMEM-FCS versetzt. Nach 48- und 96-Stunden p.i. wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert. Aus den Zell-Pellets wurde eine genomische DNA-Extraktion durchgeführt und von dieser die DNA-Konzentration im Photometer gemessen. Äquivalente Mengen DNA wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt, in welcher geeignete Primer an Sequenzen der VA-Region der Adenoviren binden (*Ad5VARNAII back Seq* und *Ad5 VARNA Seq*). Die PCR-Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zyklen abgebrochen und das Produkt auf 0,8% Agarose-Gel elektrophoretisch so aufgetrennt, dass die DNA-Mengen bei den verschiedenen PCR-Zyklen miteinander verglichen werden können. Die Größe dieser PCR-Produkte beträgt circa 700 bp (Abb. 5.18).

Aus der Beobachtung dieser PCR-Analyse heraus ergibt sich die Folgerung, dass die DNA-replikation adenoviraler Vektoren im Rahmen der Fusion nicht gestört wird. Nicht nur der Vergleich von Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal weist keine großen Unterschiede in der Intensität der PCR-amplifizierten Banden auf –weder 48- noch 96-Stunden p.i.-, sondern auch die Zugabe von FIP zum Medium führt zu keinen Veränderungen der DNA-Replikation dieser Vektoren. Dies bestätigt, dass die Replikation des adenoviralen Genoms auch im Kontext der Synzytienbildung nicht beeinträchtigt wird.



**Abb. 5.18: Semi-Quantitative PCR zur Untersuchung des Einflusses der Zellfusion auf die Gen-Replikation von adenoviralen 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren.** Mehrere Ansätze HER-911-Zellen wurden entweder mit Ad CMV F&H oder Ad CMV βGal bei einer m.o.i von 0,1 infiziert. Diese wurden in verschiedenen DMEM-FCS-Zellmedien inkubiert, die Ethanol in einer Konzentration von 1,7mM enthielten, mit oder ohne Zusatz von FIP (100μM). Dabei wurden weitere Ansätze mit normalem DMEM-FCS versetzt. Nach 48- und 96-Stunden p.i. wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert. Mit den Zell-Pellets wurde eine DNA-Extraktion durchgeführt und von dieser die DNA-Konzentration im Photometer gemessen. Äquivalente Mengen DNA wurden in einer PCR-Reaktion eingesetzt, in welcher geeignete Primer an Sequenzen der VA-I-Region der Adenoviren binden. Die PCR-Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zyklen (s. Datenbeschriftung) abgebrochen und das Produkt auf 0,8% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt **A** Aufgetragene PCR-Amplifikate der verschiedenen DNAs, die aus den bezeichneten Zellansätzen isoliert wurden.

## 5.5 Untersuchung der intrasynzytiellen Virusausbreitung

Adenovirus-Replikation und Synzytienbildung erweisen sich aus den Ergebnissen dieser Doktorarbeit als kompatible Ereignisse. Die Synthese adenoviraler Gen-Produkte und die DNA-Replikation der Vektoren bleibt im Rahmen der Fusion unbeschädigt.

Zur Zeit ist nicht vieles über die Ausbreitung adenoviraler Partikel innerhalb eines Synzytiums bekannt, und die Frage nach einer möglichen Replikation der Virus-DNA in benachbarten Kernen innerhalb dieser Struktur bleibt bisher unbeantwortet. Li und Blackwell haben versucht, diese Fragestellung zu erörtern (*Li et al., 2001*). Sie behaupten, dass Viruspartikel in der Lage sind, benachbarte, ursprünglich nicht infizierte Kerne zu erreichen bzw. zu infizieren und so die Replikationsfähigkeit fusionsfähiger Adenoviren zu fördern. In

dieser Publikation wurde die Hypothese einer „*de novo*“-*Synthese* von Adenovirus-Partikeln in benachbarten Kernen mit der Anwendung von elektronenmikroskopischen Untersuchungen belegt, in welchen Zellen mit fusionsfähigen Adenoviren bei einer niedrigeren m.o.i. (genauer nicht beschrieben) infiziert wurden. Sodann wurden diese Zellrasen nach 30 Stunden geerntet, für eine elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet und nach Viruspartikeln unter dem EM gesucht. Es fiel hier auf, dass fast alle untersuchten Kerne Viruspartikel enthielten. Aus dieser Beobachtung heraus behaupten die Kollegen, dass Adenoviren fähig sind, sich innerhalb eines Synzytiums lateral auszubreiten und andere, anfänglich nicht-infizierte Kerne zu infizieren. Über die Mechanismen der weiterführenden Infektion sind keine Ergebnisse beschrieben.

Um dieses Phänomen abklären zu können, werden in diesem Abschnitt verschiedene Experimente beschrieben, die nach Zeichen einer aktiven Replikation in den entsprechenden intrasynzytiellen Kernen suchen, nämlich die Anwesenheit entweder von Replikationszentren in der Immunfluoreszenz-Färbung gegen E2A(DBP)-Protein oder von Adenovirus-DNA, detektiert durch FISH-Analyse.

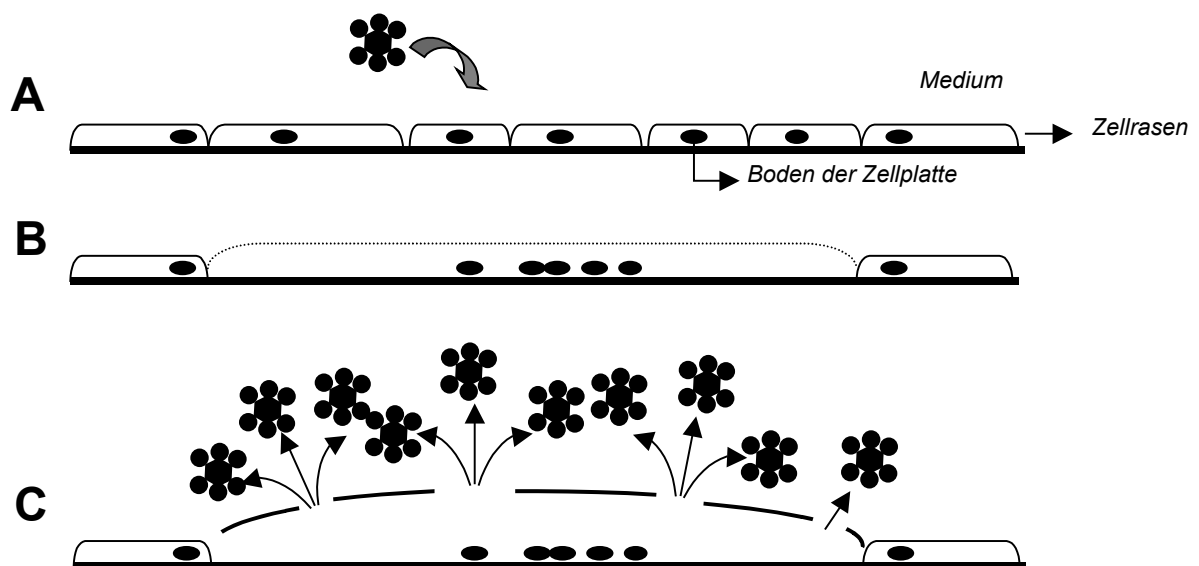
### **5.5.1 Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz**

Die Bildung von Replikationszentren in der Immunfärbung mit anti-E2A(DBP)-Antikörpern stellt ein sensitives Zeichen der adenoviralen Replikation dar. Kerne, die Replikationszentren aufweisen, treiben gerade die Replikation ihres Genomes voran.

Um eine „*Kern-zu-Kern Ausbreitung*“ beweisen zu können, wurde hier ein Experiment durchgeführt, in welchem ein Rasen von permissiven HER-911-Zellen mit Ad CMV F&H bei sehr niedriger m.o.i. infiziert wurde. Nach bestimmten Zeitpunkten (24 und 48-Stunden) wurde dieser Zellrasen fixiert, eine Färbung gegen das E2A(DBP)-Protein durchgeführt und schließlich unter dem UV-Mikroskop nach Replikationszentren in den Kernen der Synzytien gesucht.

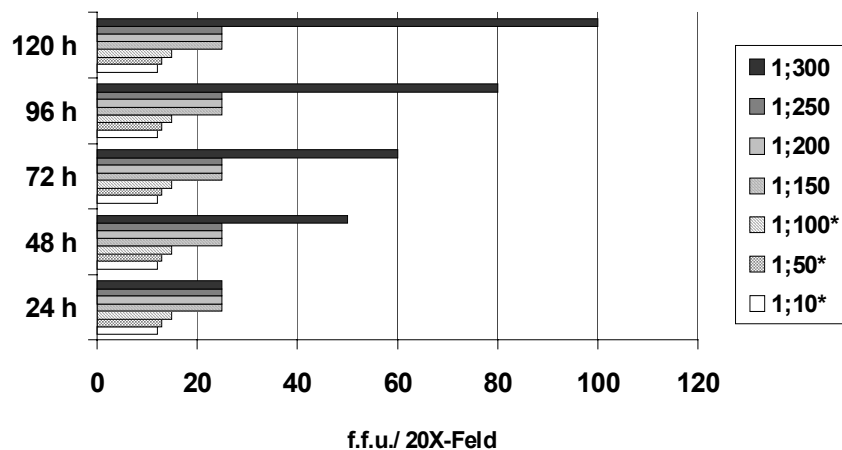
Im Verlauf eines Experiments dieser Art können falsch positive Ergebnisse aus der Freisetzung von Viruspartikeln entstehen. Ein Beispiel dafür sind jene Synzytien (Abbildung 5.19), die im Verlauf der Prozedur wegen der Unstabilität ihrer Membranen platzen und folglich eine Menge neuer Partikel in das Medium freisetzen können. Infolgedessen können diese, aus den geplatzten Synzytien freigesetzte Partikel, andere Synzytien erreichen. Viruspartikel, die auf eine konventionelle Art und Weise Synzytien infizieren, werden den DNA-Import genauso wie auf der Abbildung 5.19 durchführen. Abhängig davon, welche

„Tubulin-Schiene“ sich in der Nähe der Partikelinternalisierung befindet, werden diese Partikel sich auf verschiedene Kerne ausrichten. Die infizierten Kerne werden dann Stunden später RZ aufweisen. Mit der Verwendung von neutralisierenden Antikörperkonzentrationen gegen das Knob-Protein (verantwortlich für die Wechselwirkung mit dem CAR-Rezeptor) im Medium wird diese „Reinfizierung“ der untersuchten Synzytien vermieden. Eine neutralisierende Konzentration von den anti-Knob-Antikörpern-1D6.14 (Rogers *et al.*, 1997) wurde in dem Experiment der Abbildung 5.20 untersucht. Für die darauffolgenden Experimente, in welchen diese Ausbreitung in Zellkultur neutralisiert sein sollte, wurde eine Konzentration von 1:200 des Antikörpers im DMEM-FCS-Medium gewählt.



**Abb. 5.19: Die Ruptur der Synzytien setzt neue Virusnachkommen in das Medium frei**

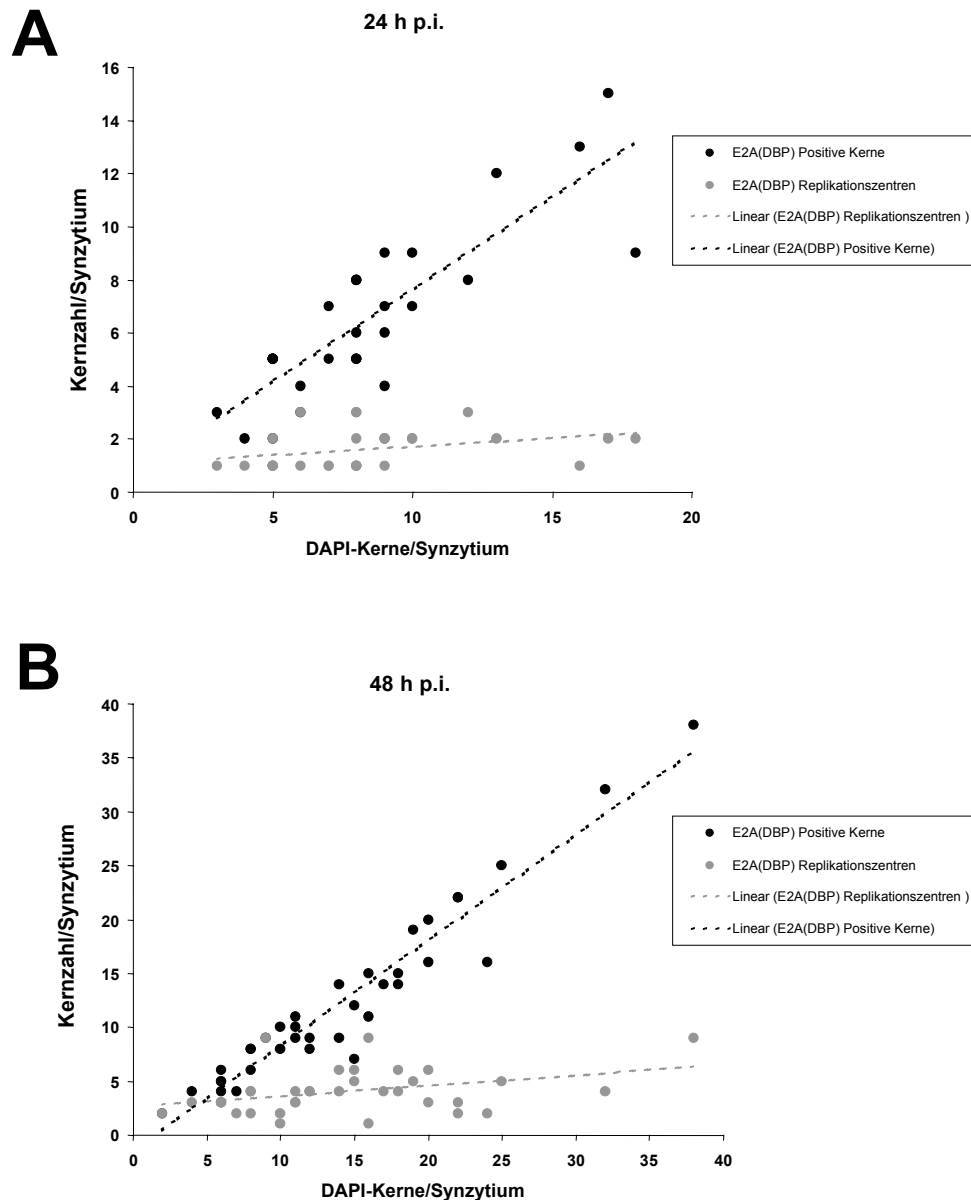
**A** Ein fusionsfähiges Adenovirus infiziert eine Zelle des Zellrasens **B** Die Synthese der Fusionsproteine führt zur Bildung eines Synzytiums. **C** Die Labilität der Zellmembranen ruft die Ruptur des Synzytiums hervor und setzt neue Viruspartikel ins Medium frei. Diese Partikel werden andere Zellen bzw. Synzytien weiterinfizieren.



**Abb. 5.20: Bestimmung der minimalen  $\alpha$ -Knob-Antikörperkonzentration zur Neutralisierung der adenoviralen Ausbreitung in Zellkultur.** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze mit 100 000 HER-911/Loch in einer 12-Loch-Platte vorbereitet. Die Zellen wurden mit einem GFP-exprimierenden Adenovirus, nämlich Ad CMV  $\beta$ Gal, bei einer m.o.i. von 0,01 infiziert und drei Stunden nach Infektionsbeginn mit jeweils 1 mL DMEM-FCS in ansteigender Konzentration mit  $\alpha$ -Knob-Antikörpern –1:10, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300- versetzt. Zur Kontrolle wurde parallel auf einen Zellansatz nur Medium gegeben. Alle 24 h p.i. wurden die infizierten Zellrasen unter UV-Mikroskop bei einer 20X-Vergrößerung beobachtet und die Zahl der GFP exprimierenden Zellen/Mikroskopfeld bestimmt. In vorliegender Illustration wurde die Zahl der GFP-exprimierenden HER-911-Zellen (f.f.u./20X-Feld, x-Achse) zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (Zeit[h], y-Achse) in Zusammenhang mit der Konzentration der Antikörper dargestellt. (\*) Bei Antikörper-Konzentrationen von 1:10, 1:50 und 1:100 wurden nach 48 h p.i. zytotoxische Effekte mit Destruktion des Zellrasen festgestellt. Die Kontrolle ohne Antikörper zeigte nach 96 Stunden mehrere Virus-Kometen.

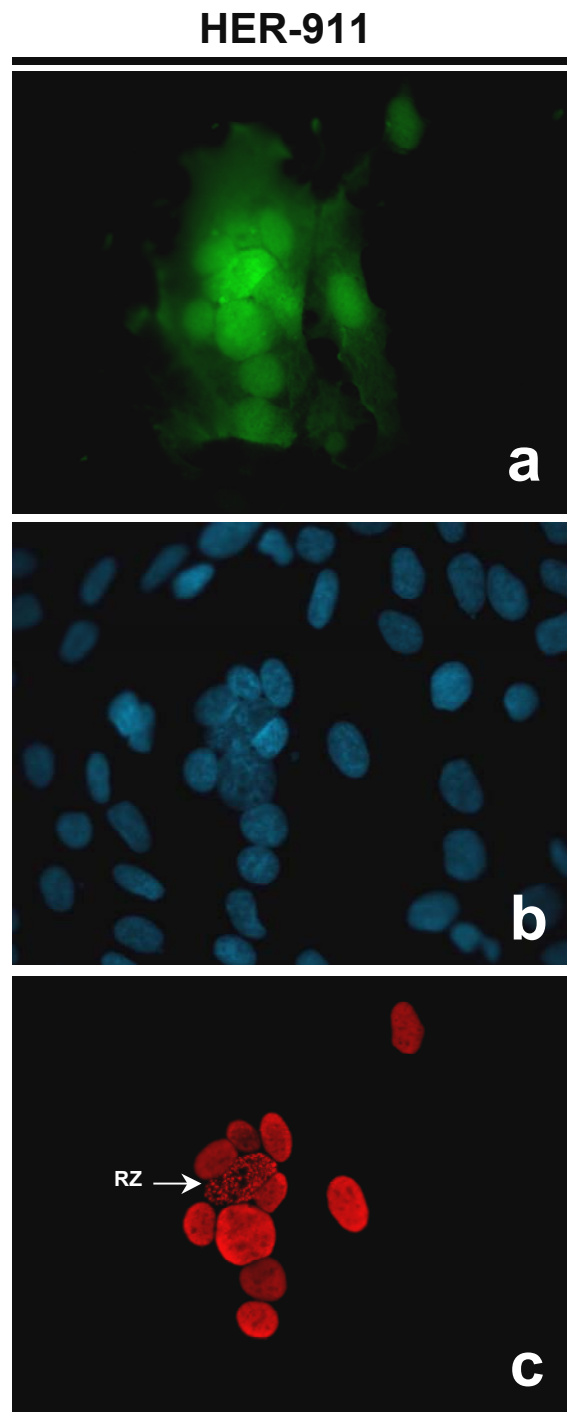
Nach der Bestimmung der minimalen  $\alpha$ -Knob-Antikörperkonzentration wurde die Untersuchung durchgeführt. Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich 1 mL DMEM-FCS mit dem Antikörper  $\alpha$ -Knob-Protein in einem Verhältnis von 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiter inkubiert. Nach 24 h und 48 h p.i. wurden die Kammer-Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Unter UV-Anregung der Fluoreszenz wurden die Synzytien beobachtet und von diesen die gesamte intrasynzytielle Kern-Zahl durch DAPI-Färbung quantifiziert. Anschließend wurden nicht nur die E2A(DBP)-positiven Kerne, sondern auch jene mit Replikationszentren (**RZ**) oder RZ-ähnlichem Muster ausgezählt. 30 Synzytien wurden auf diese Art untersucht und die ermittelten Ergebnisse der Quantifizierung auf der Abbildung 5.21 dargestellt.





**Abb. 5.21: Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb eines Synzytiums. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz.** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze aus den Zellen abgesaugt und schließlich 1 mL DMEM-FCS mit dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiter inkubiert. Nach 24 h und 48 h p.i. wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Unter UV-Anregung der Fluoreszenz wurden die Synzytien beobachtet und von diesen die gesamte intrasynzytielle Kern-Zahl durch DAPI-Färbung quantifiziert. Anschließend wurden nicht nur die E2A(DBP)-positive Kerne, sondern auch jene mit Replikationszentren ausgezählt. Dargestellt ist die Quantifizierung der intrasynzytiellen Kerne (DAPI-Kerne/Synzytium, x-Achse mit der Zahl der Kerne pro Synzytium aufsteigend geordnet) und die Zahl derer, die entweder eine positive Färbung gegen E2A(DBP)-Protein (●) oder die Anwesenheit von Replikationszentren (●) erkennen lassen. Mehr als 30 Synzytien wurden in jedem Experiment untersucht. **A** Ergebnisse der Quantifizierung nach 24- und 48-Stunden (**B**). In beiden Grafiken wurden ebenfalls Trendlinien für die E2A(DBP)- (----) und für die Replikationszentren-Anzahl (----) gezeigt.

Hier fällt auf, dass sich die Replikationszentren zu einer geringen Anzahl in den intrasynzytiellen Kernen befinden. Sowohl 24- als auch 48-Stunden p.i. weist von diesen Kernen nur ein sehr geringer Anteil entweder Replikationszentren oder RZ-ähnliche Strukturen auf. Innerhalb eines Synzytiums zeigte stets nur ein Kern die typischen RZ (Abb. 5.22). Daneben fanden sich zudem einige Kerne mit RZ-ähnlichen Strukturen. Manchmal können örtliche Akkumulierungen von E2A-Proteine -in Abwesenheit von DNA-Replikation- in der Immunfluoreszenz morphologisch als echte RZ auftreten. Das Auftreten dieser „Pseudo-RZs“ erschwert die eindeutige Lokalisation von DNA-Replikation (s.n.). Die Zahl der E2A-positiven Kerne (homogen oder RZ) steht in einem linearen Verhältnis mit den intrasynzytiellen DAPI-Kernen. Dies ist vereinbar mit der Vorstellung, dass alle Kerne, die während der Bildung eines Synzytiums inkorporiert werden, kontinuierlich die E2A-Proteine importieren.



**Abb. 5.22: Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb eines Synzytiums. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz.** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50 000 Zellen/Kammer ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,01 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze aus den Zellen abgesaugt und schließlich 1 mL DMEM-FCS mit dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiter inkubiert. Nach 48 h p.i. wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,2% Triton permeabilisiert und eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Synzytium wurden auf dem Zellrasen unter UV-Anregung der Fluoreszenz gesucht und mit geeigneten Filtern für GFP (a), DAPI (b) und das adenovirale E2A(DBP)-Protein (c) fotografiert.

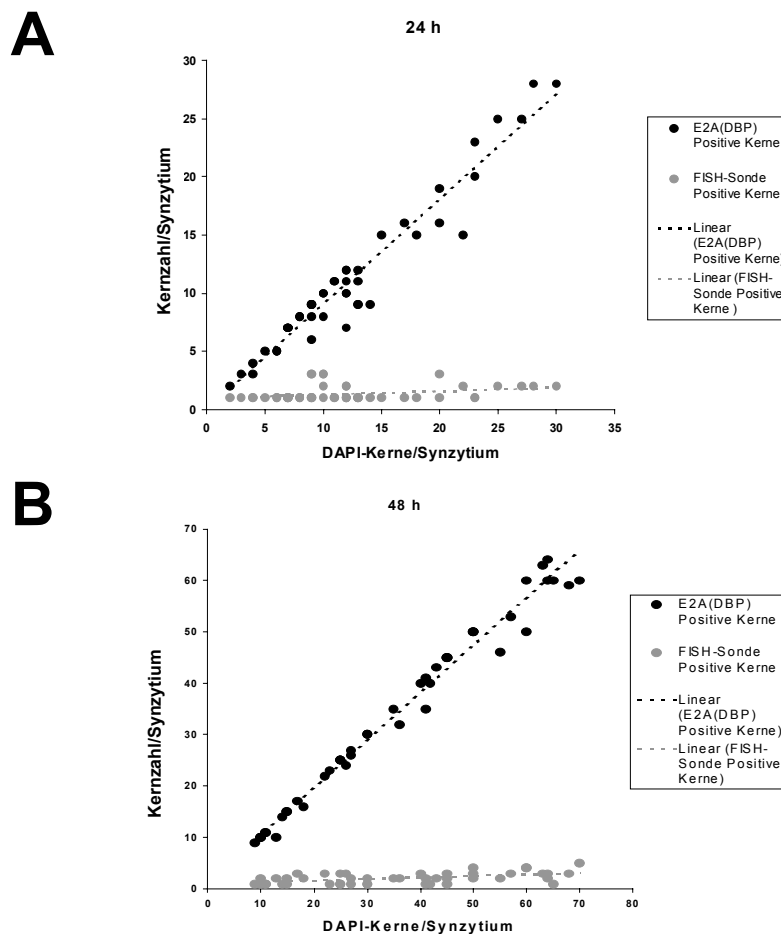
### 5.5.2 Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Anwendung der E2A-Immunfluoreszenz ist zwar ein nützliches „Werkzeug“ zur Untersuchung der DNA-Replikation in den intrasynzytiellen Kernen, aber das Auftreten von RZ-ähnlichen Strukturen schwächt die Aussagekraft dieser Methode erheblich.

Um die Qualität dieser Abschätzung zu verbessern, wurde eine FISH-Analyse durchgeführt. Dabei wird die adenovirale DNA direkt identifiziert.

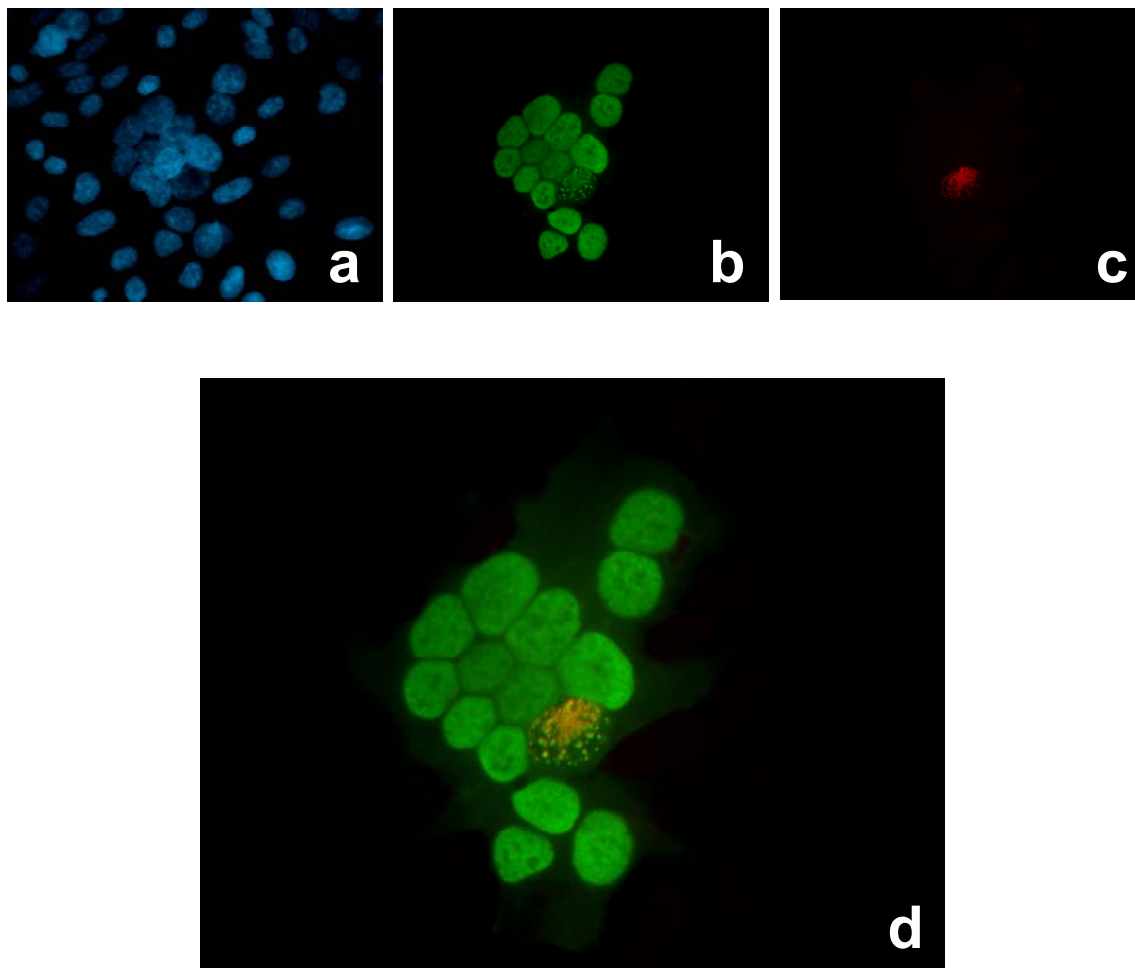
Die FISH-Analyse erlaubt die Identifizierung und Lokalisierung von zellulären oder viralen DNA- bzw. RNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit biotinylierten DNA-Sonden, die durch Nick-Translation hergestellt wurden. Die spezifische Bindung durch Zugabe von Avidin-Fluorochrom (z.B. Avidin-Texas Red) durch Fluoreszenz-Mikroskopie identifizierbar. Diese Methode kann in Kombination mit einer konventionellen Immunfluoreszenz-Färbung gegen adenovirale Proteine durchgeführt werden (z.B. E2A(DBP) oder Hexon).

Entsprechend wurde ein Experiment durchgeführt, das dem des Abschnittes 5.5.1 zwar ähnlich ist, aber FISH anwendet. Für dieses Experiment (Abb. 5.23) wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Objektträgern zu 450 000 Zellen/Objektträger ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,03 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich mit 1 mL DMEM-FCS und dem Antikörper gegen-Knob-Protein in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton permeabilisiert und für eine darauffolgende *In-situ*-Hybridisierung (*FISH*) vorbereitet. Parallel wurden die entsprechenden FISH-Sonden aus dem Plasmid pAd Easy1 (He et al., 1998) durch biotinylierende Nick-Translation hergestellt. Die biotinylierten Sonden wurden auf die Zellrasen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Detektion der Sonden wurde Avidin-Texas-Red eingesetzt. Zusätzlich wurde eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt, ebenso eine DAPI-Färbung der Kerne. Unter dem UV-Mikroskop wurden die Synzytien beobachtet und von diesen die gesamte intrasynzytielle Kern-Zahl durch DAPI-Färbung quantifiziert. Anschließend wurden nicht nur die E2A(DBP)-positiven Kerne, sondern auch jene mit FISH-positiven Sonden-Signalen ausgezählt. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung sind auf der Abbildung 5.23 dargestellt.



**Abb. 5.23: Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb einer Synzytiumbildung. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und *In-situ*-Hybridisierung (FISH).** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Objektträgern zu 450 000 Zellen/Objektträger ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,03 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich mit 1 mL DMEM-FCS und dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton permeabilisiert und für eine darauffolgende *In-situ*-Hybridisierung (FISH) vorbereitet. Parallel wurden die entsprechenden FISH-Sonden aus dem adenoviralen Plasmid pAd Easy1 durch biotinylierende Nick-Translation hergestellt. Die biotinylierten Sonden wurden auf die Zellrasen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für Detektion der Sonden wurde Avidin-Texas-Red eingesetzt. Zusätzlich wurde eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt, ebenso eine DAPI-Färbung der Kerne. Unter UV-Mikroskop wurden die Synzytium beobachtet und von diesen die gesamte intrasynzytielle Kernzahl durch DAPI-Färbung quantifiziert. Anschließend wurden nicht nur die E2A(DBP)-positiven Kerne, sondern auch jene mit FISH-positiven Sonden-Signalen ausgezählt. Dargestellt ist die Quantifizierung der intrasynzytiellen Kerne (DAPI-Kerne/Synzytium, x-Achse mit der Zahl der Kerne per Synzytium absteigend geordnet) und die Zahl derer, die entweder eine positive Färbung gegen E2A(DBP)-Protein (●) oder die Anwesenheit von FISH-positiven Sonden-Signalen (●) erkennen lassen. Mehr als 45 Kerne wurden jedes Mal untersucht. **A** Ergebnisse der Quantifizierung nach 24- und 48-Stunden (**B**). In beiden Grafiken wurden ebenfalls Trendlinien für die E2A(DBP)- (----) und für die FISH-Werte (----) gezeigt.

Bei diesen Ergebnissen fällt deutlich auf, dass innerhalb eines Synzytiums stets nur ganz wenige Kerne adenovirale DNA enthielten, nämlich fast immer nur ein Kern (Abb.5.24). Jene Synzytium, die mehr als einen sonden-positiven Kern enthielten, waren immer sehr groß. Möglicherweise sind sie aus der Fusion zwischen benachbarten Synzytium entstanden.



**Abb. 5.24: Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb eines Synzytiums. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und *In-situ*-Hybridisierung (FISH).**

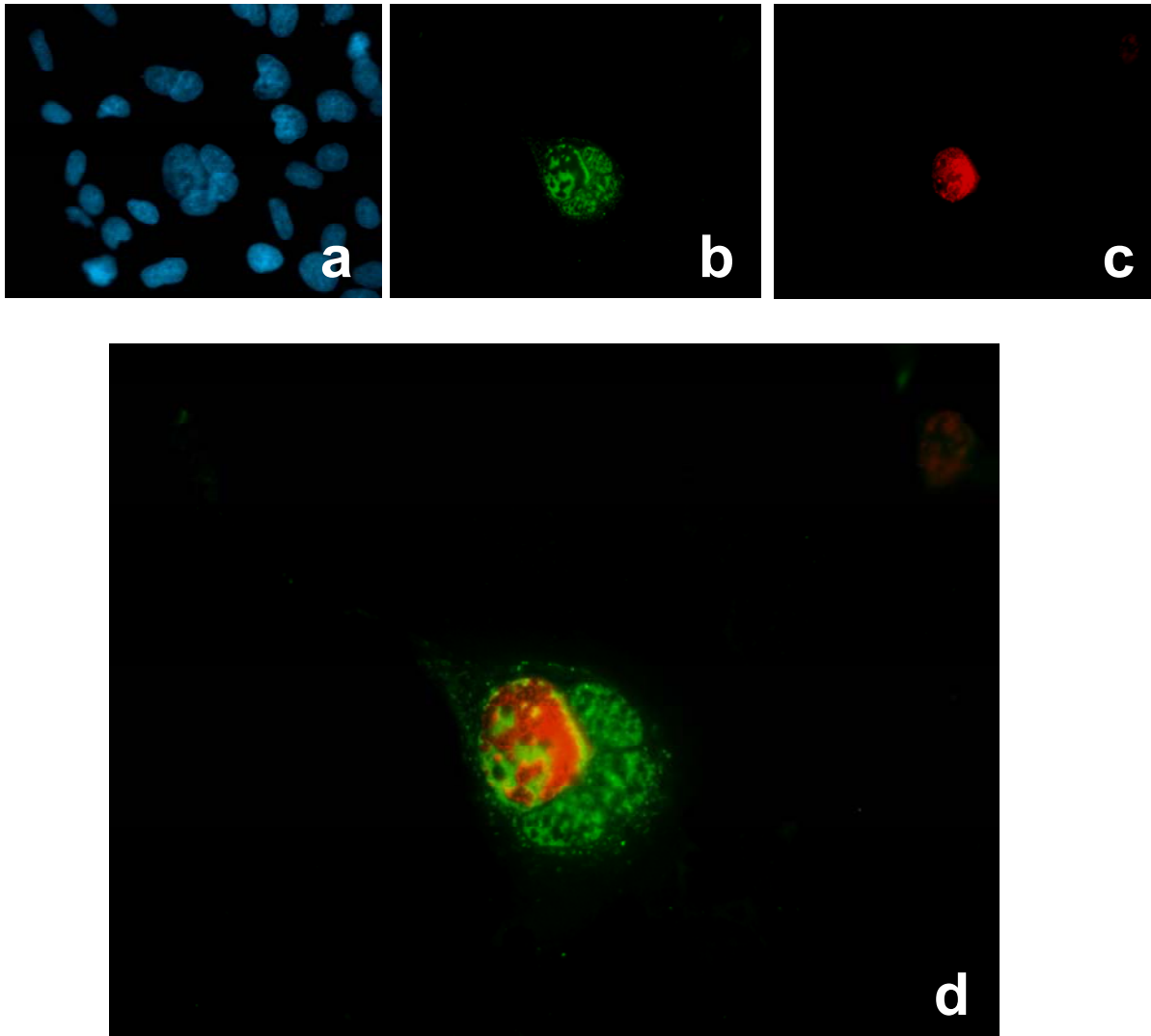
Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Objektträgern zu 450 000 Zellen/Objektträger ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,03 infiziert, drei Stunden später wurden die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich mit 1 mL DMEM-FCS und dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton permeabilisiert und für eine darauffolgende *In-situ*-Hybridisierung (FISH) vorbereitet. Parallel wurden die entsprechenden FISH-Sonden aus dem adenoviralen Plasmid pAd Easy1 durch biotinylierende Nick-Translation hergestellt. Die biotinylierten Sonden wurden auf die Zellrasen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für Detektion der Sonden wurde Avidin-Texas-Red eingesetzt. Zusätzlich wurde eine IF-Färbung gegen das adenovirale E2A(DBP)-Protein durchgeführt (Alexa-Grün), ebenso eine DAPI-Färbung der Kerne. Unter UV-Mikroskop wurden Fotoaufnahmen der Synzytien durchgeführt. Diese wurden mit Filtern für die verschiedenen Immunfärbungen -nämlich DAPI (a), E2A(DBP) (b) und adenoviralen DNA-Sonden (c) - aufgenommen. Außerdem wurde von b und c ein Merge-Foto (d) hergestellt.

Bei der Betrachtung dieser Synzytien wird klar, dass es eine strikte Korrelation zwischen der Anwesenheit von Replikationszentren und einem Sonden-Signal gibt. Die anderen Kerne, die RZ-ähnliche Strukturen enthielten, wiesen stets keine Sonden-Markierung auf.

Die Ergebnisse sind vereinbar mit der Hypothese, dass eine „*Kern-zu-Kern Ausbreitung*“ innerhalb eines Synzytiums nicht erfolgt und nur ein Kern die adenovirale DNA-Replikation vorantreibt.

In einem ähnlichen Experiment wurde ebenfalls eine FISH zur Identifizierung von adenoviraler DNA durchgeführt, aber im Unterschied zur letzten Untersuchung wurde hier eine Immunfärbung gegen strukturelle Proteine der Adenoviren eingesetzt. Das Verfahren wird in der Legende zu Abbildung 5.25 vollständig beschrieben. Das Hexon-Protein der Adenoviren bildet die Struktur der Kapsomere aus Trimeren und spielt eine zentrale Rolle bei der Morphogenese der adenoviralen Partikel. Hexon-Proteine enthalten *Kernlokalisierungssequenzen* und werden nach ihrer Synthese im Cytoplasma in den Kern zur Bildung der Viruspartikel importiert (Cullen, 2001). Abbildung 5.25 zeigt Bilder von drei Synzytien, in denen die Hexon-Färbung durch einen zweiten FITC-konjugierten-Antikörper identifizierbar wird (Abb. 5.25 [1,2,3] b). Auf diesen Bildern ist die Lokalisierung der Hexon-Proteine in drei Synzytien deutlich erkennbar. Hexon-Proteine befinden sich nicht nur im Cytoplasma, sondern auch innerhalb der Kerne. Häufig zeigen sich dabei innerhalb der Kerne kleine stabförmige Strukturen (Abb. 5.25 [3] b und d). Folglich werden Hexon-Proteine in die benachbarten Kerne eines Synzytiums importiert. Dies könnte zur Bildung leerer Viruspartikel führen. Die von Li et al. beschriebene laterale Ausbreitung von Viren innerhalb von Synzytien konnte von leeren Viruskapsiden vorgetäuscht worden sein (Li et al., 2001).

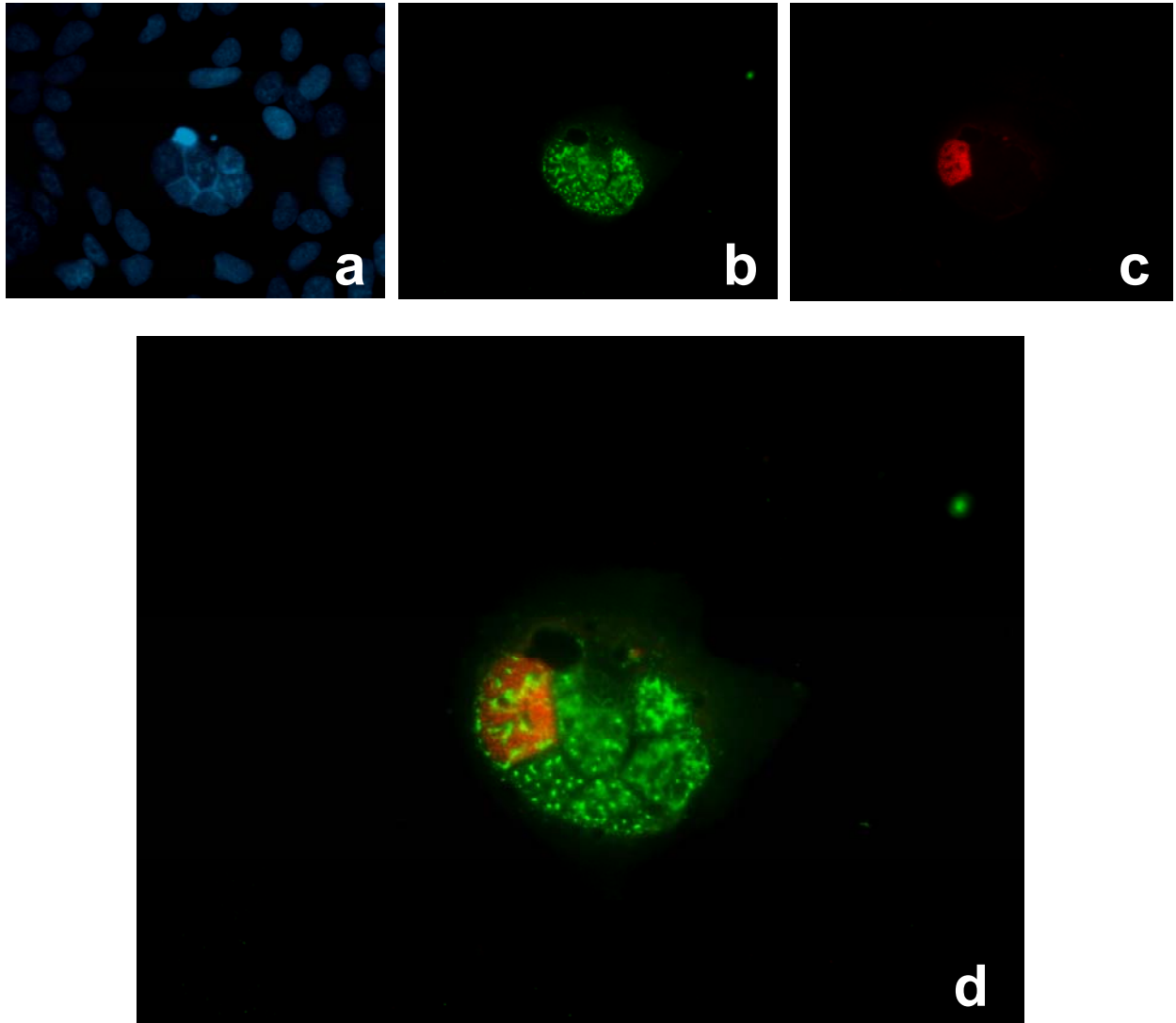
1



**Abb. 5.25 (Synzytium 1): Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb eines Synzytiums. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und *In-situ*-Hybridisierung (FISH).** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Objektträgern zu 450 000 Zellen/Objektträger ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,03 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich mit 1 mL DMEM-FCS mit dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton permeabilisiert und für eine darauffolgende *In-situ*-Hybridisierung (FISH) vorbereitet. Parallel wurden die entsprechenden FISH-Sonden aus dem adenoviralen Plasmid pAd Easy1 durch biotinylierende Nick-Translation hergestellt. Die biotinylierten Sonden wurden auf die Zellrasen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für Detektion der Sonden wurde Avidin-Texas-Red eingesetzt. Zusätzlich wurde eine IF-Färbung gegen das adenovirale Hexon-Protein durchgeführt. Diese Markierung ist mit der Anwendung von einem zweiten FITC-konjugierten-Antikörper nachgewiesen worden. Ebenso wurde eine DAPI-Färbung zur Erkennung der Kerne durchgeführt. Unter UV-Mikroskop wurden die Synzytien fotografiert. Diese Bilder wurden mit Filtern für die verschiedenen Immunfärbungen -nämlich DAPI (a), Hexon-Protein (b) und adenoviralen DNA-Sonden (c) - aufgenommen. Außerdem wurde von b und c ein Merge-Foto (d) hergestellt.

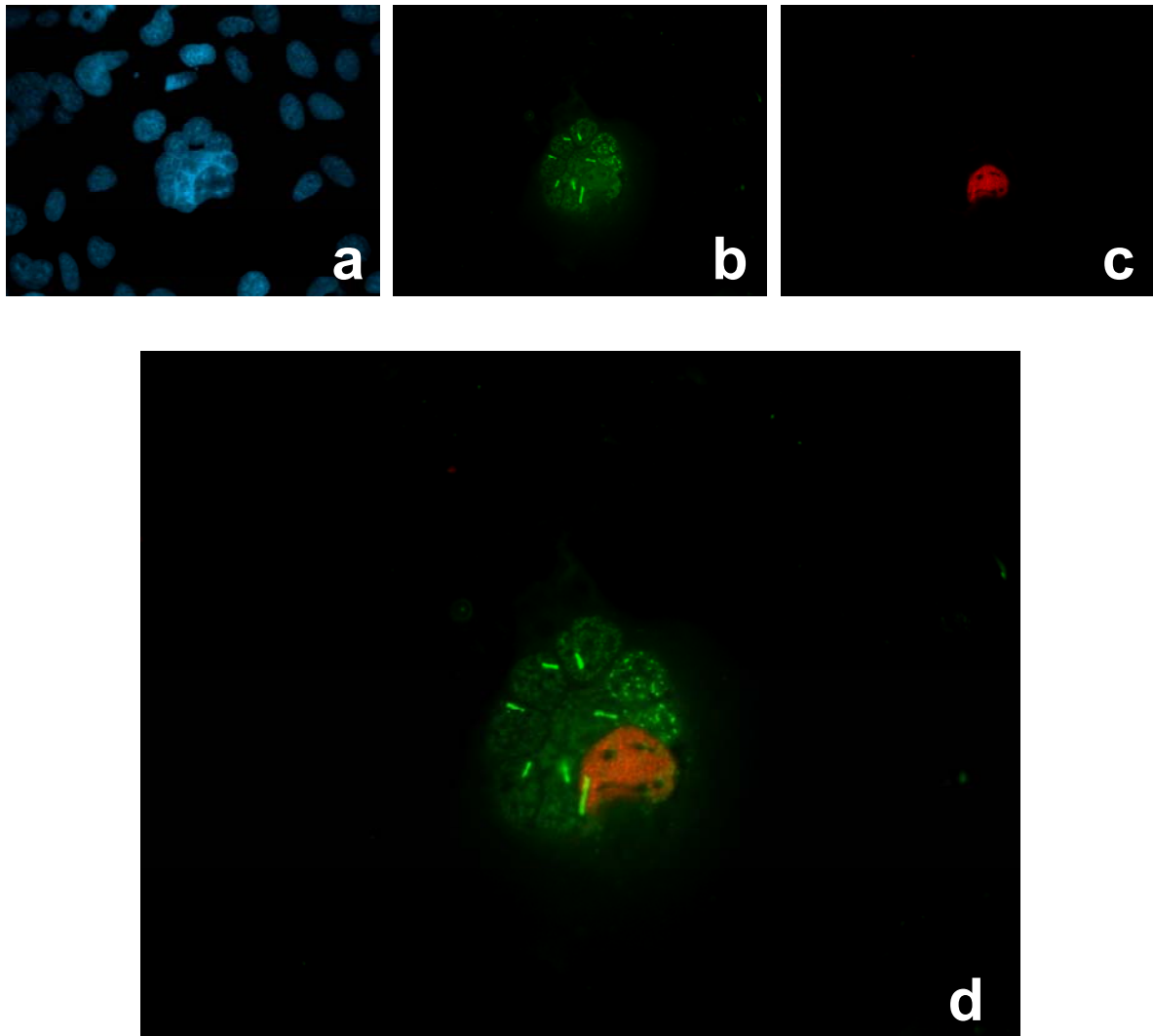


## 2



**Abb. 5.25 (Synzytium 2): Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb eines Synzytiums. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und *In-situ*-Hybridisierung (FISH).** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Objektträgern zu 450 000 Zellen/Objektträger ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,03 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich mit 1 mL DMEM-FCS mit dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton permeabilisiert und für eine darauffolgende *In-situ*-Hybridisierung (FISH) vorbereitet. Parallel wurden die entsprechenden FISH-Sonden aus dem adenoviralen Plasmid pAd Easy1 durch biotinylierende Nick-Translation hergestellt. Die biotinylierten Sonden wurden auf die Zellrasen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für Detektion der Sonden wurde Avidin-Texas-Red eingesetzt. Zusätzlich wurde eine IF-Färbung gegen das adenovirale Hexon-Protein durchgeführt. Diese Markierung ist mit der Anwendung von einem zweiten FITC-konjugierten-Antikörper nachgewiesen worden. Ebenso wurde eine DAPI-Färbung zur Erkennung der Kerne durchgeführt. Unter UV-Mikroskop wurden die Synzytien fotografiert. Diese Bilder wurden mit Filtern für die verschiedenen Immunfärbungen -nämlich DAPI (a), Hexon-Protein (b) und adenoviralen DNA-Sonden (c) - aufgenommen. Außerdem wurde von b und c ein Merge-Foto (d) hergestellt.

3



**Abb. 5.25 (Synzytium 3): Untersuchung der adenoviralen Replikation innerhalb eines Synzytiums. Abschätzung einer potenziell intrasynzytiellen Virusausbreitung durch Immunfluoreszenz und *In-situ*-Hybridisierung (FISH).** Für dieses Experiment wurden am Vortag mehrere Ansätze von HER-911-Zellen auf Objektträgern zu 450 000 Zellen/Objektträger ausgesät. Diese wurden mit Ad CMV F&H mit einer m.o.i. von 0,03 infiziert, drei Stunden später die Infektionsansätze von den Zellen abgesaugt und schließlich mit 1 mL DMEM-FCS mit dem Antikörper gegen-Knob-Protein (1D6.14) in einem Verhältnis 1:200 versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die infizierten Zellen bei 37°C weiterinkubiert. Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Objektträger mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton permeabilisiert und für eine darauffolgende *In-situ*-Hybridisierung (FISH) vorbereitet. Parallel wurden die entsprechenden FISH-Sonden aus dem adenoviralen Plasmid pAd Easy1 durch biotinylierende Nick-Translation hergestellt. Die biotinylierten Sonden wurden auf die Zellrasen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Für Detektion der Sonden wurde Avidin-Texas-Red eingesetzt. Zusätzlich wurde eine IF-Färbung gegen das adenovirale Hexon-Protein durchgeführt. Diese Markierung ist mit der Anwendung von einem zweiten FITC-konjugierten-Antikörper nachgewiesen. Ebenso wurde eine DAPI-Färbung zur Erkennung der Kerne durchgeführt. Unter UV-Mikroskop wurden die Synzytien fotografiert. Diese Bilder wurden mit Filtern für die verschiedenen Immunfärbungen -nämlich DAPI (a), Hexon-Protein (b) und adenoviralen DNA-Sonden (c) - aufgenommen. Außerdem wurde von b und c ein Merge-Foto (d) hergestellt.

## **5.6 Expression der Fusionsproteine in der späten Phase der Adenovirus-Replikation**

Die Expression von Masernvirusprotein-F und -H erfolgt unter der Stimulierung eines sehr aktiven, aber unspezifischen CMV-Promoters. Diese unter CMV-Promoter gesteuerte Expression führt zu starker Transkription bzw. Synthese dieser Fusionsproteine, bereits in den ersten Stunden des adenoviralen Replikationszyklus. Diese Eigenart führt zu einer unspezifischen Zytotoxizität. Konditional-replizierende Adenoviren haben den Vorteil, ihre Replikations- bzw. Zerstörungsfähigkeit auf Tumorzellen zu beschränken. Auf diese Art wird in der klinischen Anwendung ein Befall des umliegenden normalen Gewebes bei einer Virus-Injektion verhindert. Konditional-replizierende Adenoviren, die unspezifisch Fusionsproteine zur Verstärkung der Zytotoxizität synthetisieren, würden diese Tumorbeschränkungsfähigkeit teilweise verlieren.

Dazu wurde ein Vektor, -Ad MLP F&H genannt- hergestellt, der beide Masern-Fusionsproteine unter der Kontrolle eines adenoviralen späten Promoters exprimiert, des MLP-Promoters (*Major Late Promoter*). Dieser Promoter ist in Adenoviren dafür zuständig, die Expression der adenoviralen späten Proteine (L1, L2, L3, L4, etc) zu stimulieren. Die Expression dieser strukturellen Proteine erfolgt, unter der Kontrolle des MLP-Promoters, in der späten Phase des Replikationszyklus. Die Trans-Aktivierung dieses Promoters benötigt eine komplexe Wechselwirkung mit verschiedenen Faktoren, die in der Einleitung dieser Doktorarbeit beschrieben wurden. Ein MLP-Promoter wird erst nach Beginn der DNA-Replikation aktiv, circa 20 Stunden p.i. (*Fields, 1998*).

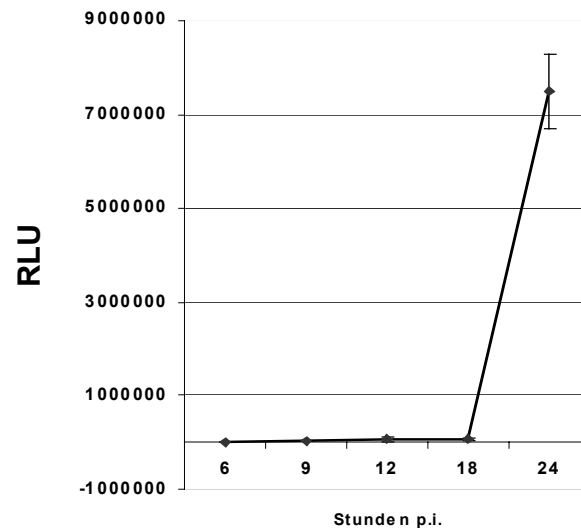
Mit der Anwendung dieses MLP-Promoters wurde versucht, die Expression der Fusionsproteine auf Zellen mit replizierendem Virus zu beschränken.

### **5.6.1 Charakterisierung der Expression von Transgen-Produkten unter der Kontrolle eines adenoviralen MLP-Promoters (*Major Late Promoter*)**

Zur Charakterisierung der unter MLP-Promoter stehenden Transgen-Expression wurde ein 1<sup>st</sup>Generations-Vektor hergestellt, der unter einem MLP-Promoter die kodierenden Sequenzen zur Expression von Luziferase enthält. Dieser Vektor wurde als Ad MLP Luc<sup>+</sup> bezeichnet und seine Struktur schon im Abschnitt 5.4.2 beschrieben.

Um die Aktivität dieses Promoters zu untersuchen, wurde ein Experiment durchgeführt, in welchem permissive HER-911-Zellen mit dem Ad MLP Luc<sup>+</sup> Vektor infiziert und durch regelmäßige Ernte und Lysis der Zellrasen die Luziferase-Aktivität mit der Verwendung eines

Luminometers gemessen wurde. In Abbildung 5.26 ist die Durchführung dieses Experimentes erklärt und die ermittelten Luziferase-Aktivitätswerte dargestellt.



**Abb. 5.26: Transgen-Expression eines Reportervirus (*Ad MLP Luc<sup>+</sup>*), das Luziferase unter der Kontrolle des adenoviralen MLP-Promoters exprimiert.** Für dieses Experiment wurden am Vortag 100 000 HER-911 auf eine 12-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit *Ad MLP Luc<sup>+</sup>* mit einer m.o.i. von 1 infiziert. 6 Stunden nach Beginn der Infektion wurde ein Zellansatz alle 3 Stunden geerntet, dieser mit geeignetem Lyse-Puffer behandelt und schließlich die Luziferase Aktivität des Lysates im Luminometer gemessen. Darüber hinaus wurde seine Proteinkonzentration bestimmt, damit die Luziferase Aktivität normiert werden konnte. Gezeigt ist eine Luziferase-Aktivitätskurve (A), die die Luziferase-Aktivität (RLU, y-Achse) der entsprechenden Zellansätze (Stunden p.i., x-Achse) darstellt.

Bei der Beobachtung der Luziferase-Aktivitätskurve fällt hier deutlich auf, dass der MLP-Promoter erst nach 20 Stunden p.i. aktiv ist bzw. die Transgen-Expression stark induziert wird. Die Luziferase-Aktivität, die in den ersten 18 Stunden p.i. Werte nicht höher als 130.000 RLU (*Relative Luciferase Units*) erreicht, wird sechs Stunden später Werte von  $8 \times 10^6$  ergeben, also das 61-Fache.

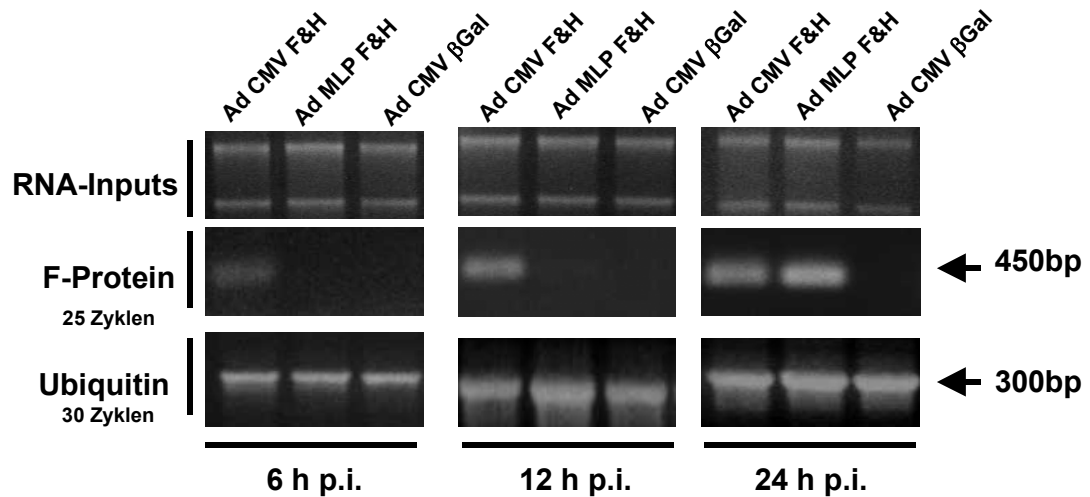
Der MLP-Promoter weist dannach zwar eine sehr geringe basale Aktivität auf, aber seine Aktivierung erfolgt nach dem Eintritt in die späte Phase der Virusreplikation. Diese Expressionskinetik wird auch beibehalten, wenn der MLP-Promoter ein Transgen steuert.

### 5.6.2 Einfluss der MLP-Promoter-Aktivität auf die Transkription von Fusionsproteinen

Um die Expression von Fusionsproteinen unter Einfluss eines MLP-Promoters charakterisieren zu können, wurde ein 1<sup>st</sup>Generations-Vektor hergestellt, der unter einem MLP-Promoter die kodierenden Sequenzen der Masernvirus-Proteine-F und -H enthält. Dieser Vektor wurde als Ad MLP F&H bezeichnet und seine Struktur schon im Teil „*Materialien und Methoden*“ beschrieben.

Die Transkription von den Fusionsproteinen wurde durch RT-PCR-Analyse charakterisiert. So wurde die Quantifizierung der Masernvirus-Protein-F-mRNA von Ad CMV F&H und Ad MLP F&H infizierten HER-911-Zellen durchgeführt (Abb. 5.27).

Für dieses Experiment wurden HER-911-Zellenansätze mit Ad CMV F&H, Ad MLP F&H oder Ad CMV  $\beta$ Gal (Negativ-Kontrolle) mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Nach 6-, 12- und 24-h p.i. wurde die RNA aus den Zellen mit Trizol isoliert. Die isolierte RNA wurde zusätzlich mit DNase behandelt. Äquivalente Mengen an RNA (RNA-Inputs) wurden mit spezifischen Primern für Regionen des Proteins-F revers transkribiert (*HA RTprimer*). Genauso wurden Sequenzen des zellulären Ubiquitin-Proteins als Kontrollparameter dieser Untersuchung mit einem geeigneten Primer zur Reversen Transkription behandelt (*Ubiq RT Primer*). Die erhaltenen cDNAs wurden in mehreren Ansätzen mit spezifischen Primern PCR-amplifiziert (*HA hin für RT und HA rück für RT*), die PCR zu unterschiedlichen Zyklen abgebrochen und das Produkt auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die von Ubiquitin revers-transkribierten Proben wurden ebenfalls durch eine PCR-Reaktion amplifiziert (*Ubiq hin Primer und Ubiq rück Primer*). Die Auftrennung dieser PCR-Produkte ergab Fragmente von 450bp (F-Protein) bzw. 300bp (Ubiquitin).



**Abb. 5.27: Einfluß des MLP-Promoters auf die Transkription von Fusionsproteinen. RT-PCR zur Quantifizierung der Masernvirus-Protein-F-mRNA von *Ad CMV F&H* und *Ad MLP F&H* infizierten HER-911-Zellen.** HER-911-Zellenansätze wurden mit *Ad CMV F&H*, *Ad MLP F&H* oder *Ad CMV βGal* mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Nach 6-, 12- und 24-h p.i. wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Äquivalente Mengen an RNA (RNA-Inputs) wurden mit spezifischen Primern für Regionen des Proteins-F revers transkribiert. Die erhaltenen cDNAs wurden in mehreren Ansätzen mit spezifischen Primern PCR-amplifiziert, die PCR zu unterschiedlichen Zyklen abgebrochen und das Produkt auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. A Bilder der elektrophoretischen Auftrennung. Die obere Reihe zeigt die äquivalenten Mengen RNA, die zur reversen Transkription verwendet wurden. Die PCR-Produkte des Proteins-F sind in der mittleren Bilderreihe zu erkennen, wo jeweils Fragmente von 450 bp amplifiziert wurden. Die untere Folge zeigt die PCR-Produkte von amplifizierten Ubiquitin-Sequenzen, die als Kontrolle eingesetzt wurden.

Die Betrachtung dieser semi-quantitativen Analyse zeigt erneut die späte Induzierbarkeit der unter MLP-Promoter stehenden Transgen-Expression. Dies ist der Fall der Protein-F-Transkripte, die aus *Ad MLP F&H* infizierten Zellen isoliert wurden. Erst 24 Stunden p.i. werden diese Gene (F- und H-Protein) unter der späten Wirkung des MLP-Promoters stark synthetisiert (*Ad MLP F&H*, 24h p.i.).

Anders ist dies im Fall des *Ad CMV F&H*-Vektors, der bereits in den ersten Stunden der Infektion eine starke Stimulierung der F- und H-Protein-Transkription auslöst.

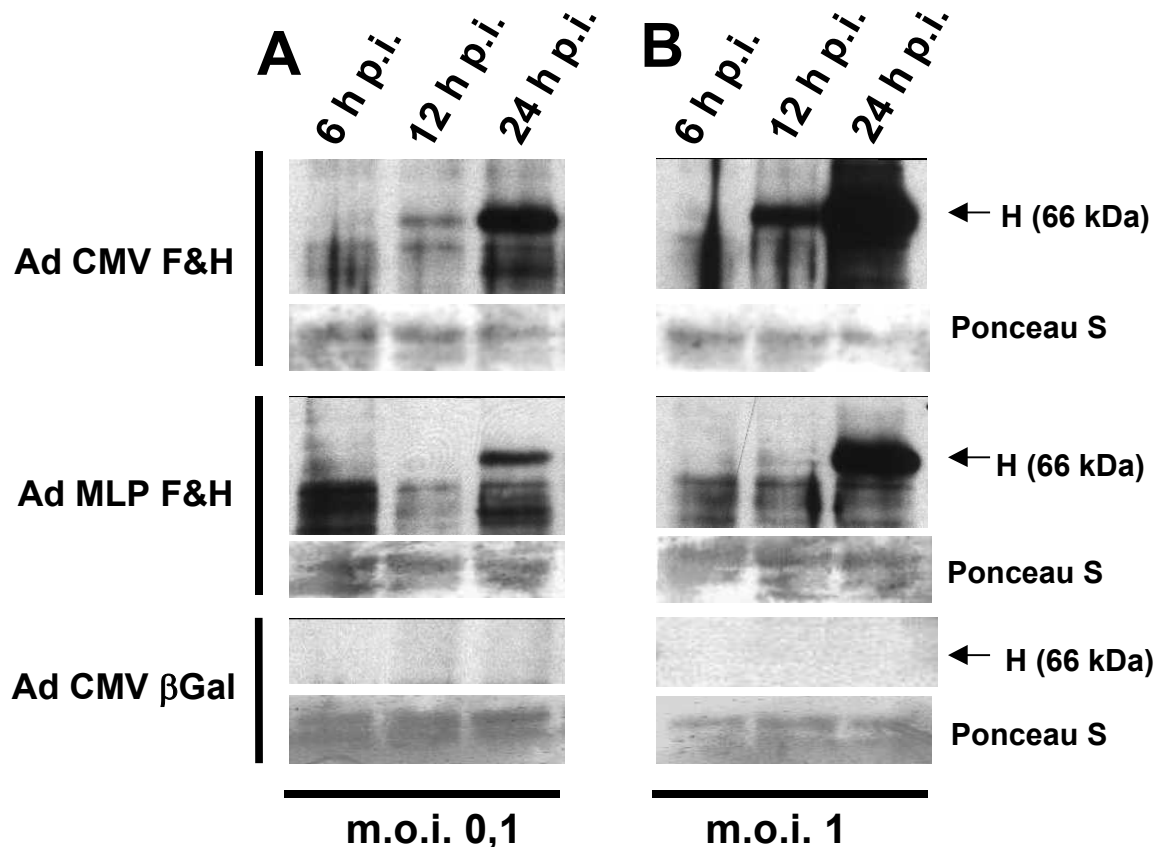
Die Transkription der Fusionsproteine in den *Ad MLP F&H* infizierten Zellen wird tatsächlich in der späten Phase der Virusreplikation stimuliert, wobei die Transkription jener Gene bei *Ad CMV F&H* schon in den ersten Stunden der Infektion vorangetrieben wird.

### **5.6.3 Wirkung der MLP-Promoter-Aktivität auf die Synthese von Fusionsproteinen**

Zur Festlegung der unterschiedlichen Zeitpunkte, zu welchen die Expression der Fusionsproteine unter der Kontrolle von CMV- und MLP-Promoter auftritt, wurde das folgende Experiment durchgeführt, in welchem die an der Zelloberfläche vorhandenen H-Proteine nach Biotinylierung und anschließender Ernte in einem Western Blot detektiert wurden.

Wie in Abbildung 5.28 erklärt ist, wurden für dieses Experiment mehrere HER-911-Zellansätze entweder mit Ad CMV F&H bzw. Ad MLP F&H oder Ad CMV  $\beta$ Gal –als Kontrolle- verwendet und bei m.o.i. von 0,1 und 1 infiziert. Nach 6-, 12- und 24-h p.i. wurden die Zellrasen biotinyliert, mit RIPA geerntet und lysiert. Äquivalente Volumina wurden zur Feststellung der zeitlich unterschiedlichen Expression von Masernvirus-Protein-H in SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Blots wurden dann mit Antikörpern gegen Protein-H-Epitope gefärbt. Um die aufgetragenen Proteinmengen sichtbar zu machen, wurde schließlich die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S gefärbt.

Es fällt auf, dass die Expression von synthetisierten H-Proteinen aus den Ad MLP F&H infizierten Zelloberflächen erst in der späten Phase der Virusreplikation auftritt. Auf Grund dessen sind die H-Proteine erst nach 24 Stunden auf der Oberfläche infizierter Zellen im Western Blot zu erkennen. Diese Ergebnisse sind von der verwendeten m.o.i. unabhängig; sowohl bei einer m.o.i. von 0,1 als auch bei einer höheren als 1 sind diese Proteine erst nach 24 Stunden in dem Western Blot zu beobachten. Demgegenüber exprimieren die Ad CMV F&H-infizierten Zellen bereits in den ersten zwölf Stunden der Infektion diese Proteine.



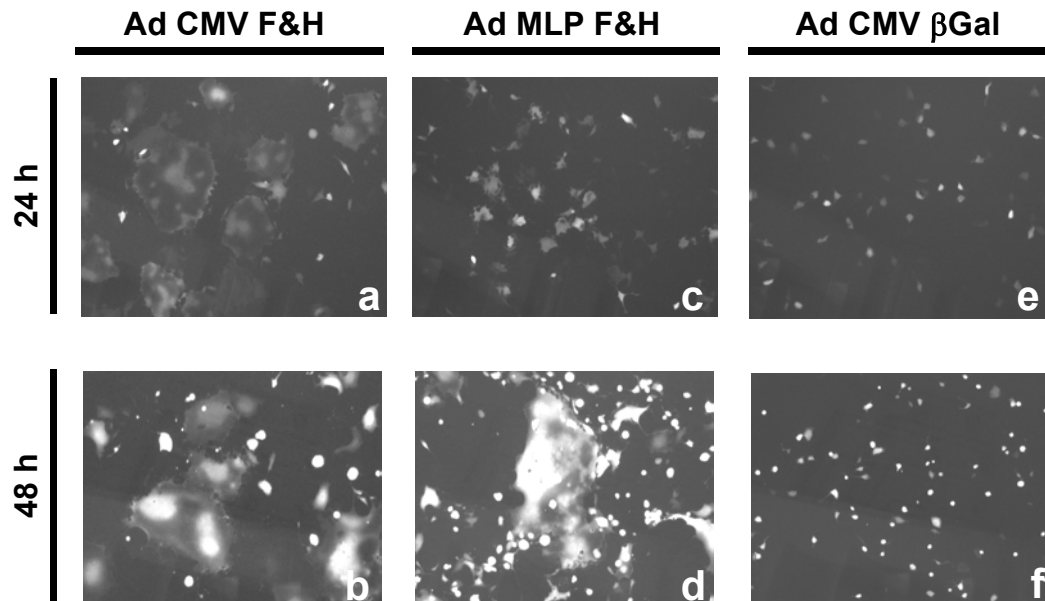
**Abb. 5.28: Wirkung der MLP-Promoter-Aktivität auf die Synthese von Fusionsproteinen. Western Blot zur Abschätzung der verzögerten Expression von *Ad MLP F&H* im Vergleich zu *Ad CMV F&H*.** Zur Festlegung der unterschiedlichen Zeitpunkte, zu welchen die Expression der Fusionsproteine unter der Kontrolle von CMV- und MLP-Promoter auftritt, wurde das folgende Experiment durchgeführt, wobei mehrere HER-911-Zellansätze entweder mit *Ad CMV F&H* bzw. *Ad MLP F&H* oder *Ad CMV βGal* –als Kontrolle verwendet– bei m.o.i. von 0,1 und 1 infiziert wurden. Nach 6-, 12- und 24-h p.i. wurden die Zellen mit RIPA geerntet und lysiert. Äquivalente Volumina wurden zur Feststellung der zeitlich unterschiedlichen Expression von Masernvirus-Protein-H in SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Blots wurden dann mit Antikörpern gegen Protein-H-Epitope gefärbt. Zur Auswertung der aufgetragenen Proteinmengen wurden schließlich die Nitrocellulosemembrane mit Ponceau S gefärbt. Auf dem Bild sind die Western Blots der m.o.i. 0,1 (**A**) und m.o.i. 1 (**B**) zu erkennen. Die Laufhöhe des H-Proteins ist rechts angegeben.

#### 5.6.4 Einfluss des MLP-Promoters auf die Synthese von Fusionsproteinen und seine Auswirkung auf die Entstehung der Synzytien

Um die Auswirkung dieser unter MLP-Promoter zeitlich unterschiedlichen Expression von F- und H-Fusionsproteine zu untersuchen, wurden permissive Zellen jeweils mit den fusionsfähigen Vektoren (*Ad CMV F&H* oder *Ad MLP F&H*) mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Genauso wurden parallel andere Zellansätze mit *Ad CMV βGal* (als Kontrolle)



infiziert. Die infizierten Zellrasen wurden nach 24 und 48 Stunden untersucht (Abbildung 5.29).



**Abb. 5.29: Einfluß des MLP-Promoters auf die Synthese von Fusionsproteinen und seine Auswirkung auf das Auftreten von Synzytien.** Zur Abschätzung des zeitlich unterschiedlichen Auftretens der Synzytien in dem Zellrasen, wurden HER-911-Zellrasen mit Ad CMV F&H, Ad MLP F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal mit einer m.o.i. von 0,1 infiziert. Nach 24- und 48-h p.i. wurden die infizierten Zellrasen unter UV-Mikroskop mit Phasenkontrast beobachtet und von jenen Fotoaufnahmen durchgeführt. A Fotoaufnahme der mit Ad CMV F&H (a,b), Ad MLP F&H (c,d) und Ad CMV  $\beta$ Gal (e,f) –als Kontrolle verwendet- infizierten Zellrasen unter UV-Licht bei 20X –Vergrößerung. An der oberen Reihe stehen die Fotoaufnahmen der ersten 24-Stunden p.i. und an der unteren diejenigen, die nach 48-Stunden p.i. fotografiert wurden. Die infizierten Zellen werden hier erkennbar, weil die drei oben genannten Vektoren eine GFP-Expressions-Kassette enthalten.

Die Untersuchung der infizierten Zellrasen zeigt unterschiedliche Größen und Auftrittszeiten, je nachdem, was für ein Vektor verwendet wurde. Die HER-911-Zellansätze, die mit Ad CMV F&H infiziert wurden, zeigen bereits nach 24 Stunden die Anwesenheit von großen Synzytien, die auf Grund der GFP-Expression sichtbar gemacht werden können (Abb. 5.29, a). Diese Synzytien beteiligen circa 7 -10 Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen die Ad MLP F&H-infizierten Zellrasen unfusionierte Zellen oder die Bildung sehr kleiner Synzytien, die nicht mehr als drei Zellen einbeziehen (Abb 5.29, c). Die Zellansätze, die mit Ad CMV  $\beta$ Gal infiziert wurden, zeigen eine spärliche Anzahl von GFP-leuchtenden, infizierten Zellen ohne Synzytien (Abb. 5.29 e).

Die Betrachtung dieser Zellrasen nach 48 Stunden ergibt andere Befunde. Sowohl die Ad CVM F&H -als auch die Ad MLP F&H- infizierten Zellrasen zeigen gleichmäßig eine erhebliche Fusionsaktivität, die eine große Zahl von Zellen beteiligt und sich bei den beiden Vektoren nicht unterscheiden lässt (Abb 5.29, b und d ). Die Ad CMV  $\beta$ Gal-infizierten Zellen

zeigen sich hier abgerundet und ergeben eine stärkere GFP-Expression; bei diesen Zellen sind keine anderen zytopathischen Effekte zu beobachten (Abb. 5.29 f).

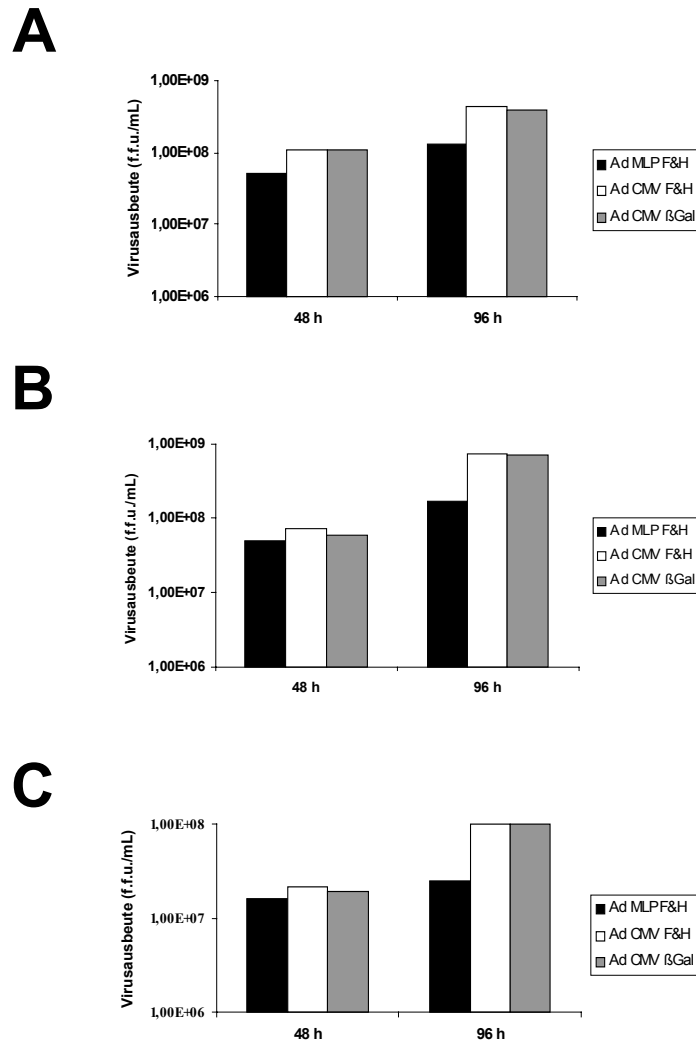
Die bei Ad MLP F&H verzögerte Expression der Fusionsproteine verzögert also das Auftreten der Synzytien.

#### **5.6.5 Einfluss der unter MLP-Promoter gesteuerten Fusion auf die Replikation von 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren**

Um die Replikationsfähigkeit des Ad MLP F&H-Vektors zu charakterisieren, wurden mehrere Ansätze von HER-911-Zellen mit Ad MLP F&H, Ad CMVF&H und Ad CMV  $\beta$ Gal mit absteigenden m.o.i.'s -10, 1, 0,1- infiziert. Die infizierten Zellen wurden mit normalem DMEM-FCS behandelt. Nach 48- und 96 Stunden wurde ein Ansatz geerntet, eine Virussuspension erstellt und diese titriert. Die ermittelten Virustiter sind in Abbildung 5.30 dargestellt.

Bei Betrachtung der Titer fällt auf, dass die Expression von den Fusionsproteinen unter MLP-Promoter einen schädlichen Einfluss auf die Replikation der Vektoren hat. Verglichen mit den Ad CMV F&H- und Ad CMV  $\beta$ Gal-Vektoren ist die Replikationsfähigkeit des Ad MLP F&H-Vektors geringer.

Desweiteren kann eine MLP-Promoter regulierte Expression von F- und H-Fusionsproteinen die Replikationsfähigkeit adenoviraler 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren verschlechtern.



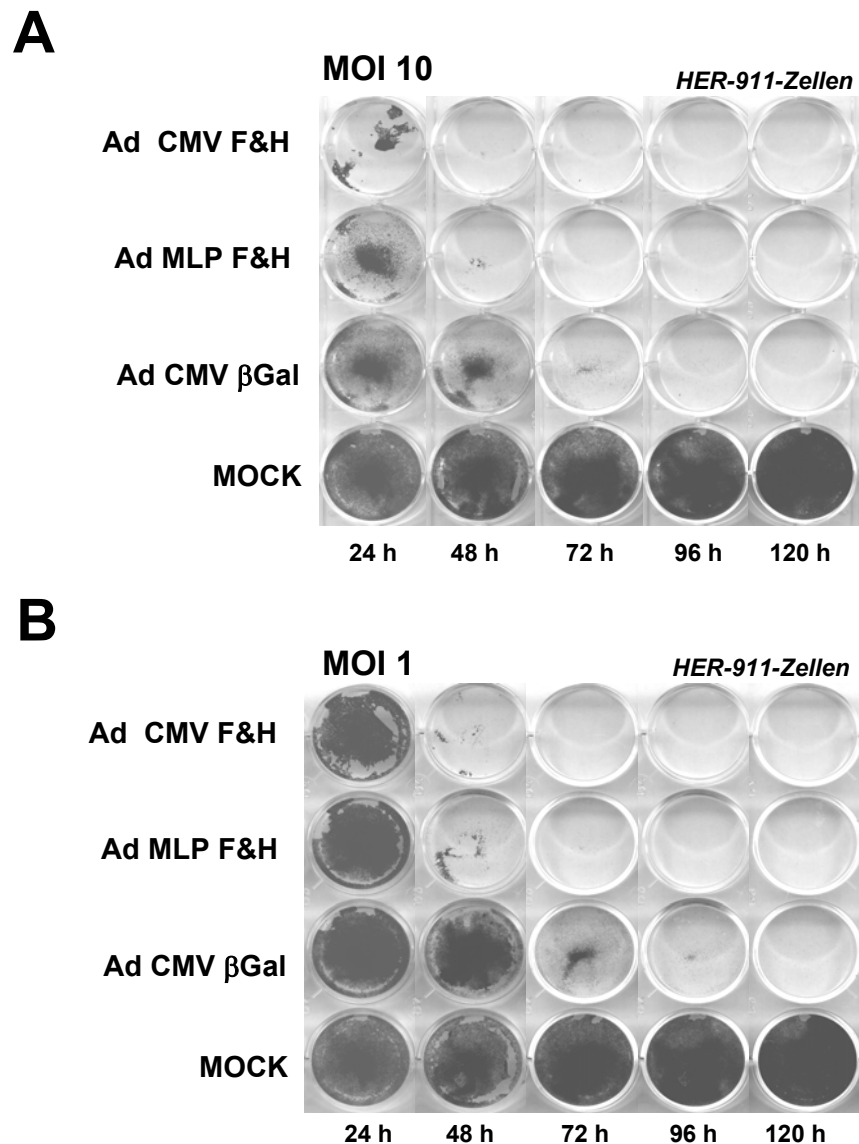
**Abb. 5.30: Replikation der adenoviralen Vektoren, *Ad MLP F&H*, *Ad CMV F&H* und *Ad CMV βGal* auf HER-911-Zellen. Einfluß der unter MLP-Promoter gesteuerten Fusion auf die Replikation von 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren.** Mehrere Ansätze von HER-911-Zellen wurden mit *Ad MLP F&H*, *Ad CMV F&H* und *Ad CMV βGal* mit absteigenden m.o.i.'s -10, 1, 0,1- infiziert. Die infizierten Zellen wurden nur mit normalem DMEM-FCS behandelt. Nach 48- und 96-Stunden wurde ein Ansatz geerntet, eine Virussuspension erstellt und diese titriert. Dargestellt sind die entsprechenden Virustiter (Virusausbeute (ff.u./mL), y-Achse) zu verschiedenen Zeitpunkten, 48- und 96-Stunden p.i. (Zeit [h], x-Achse) von *Ad MLP F&H* (■), *Ad CMV F&H* (□) und *Ad CMV βGal* (▒).

Auf dem Bild sind die verschiedenen Zellansätze gezeigt, die mit einer m.o.i. von 10 (**A**), 1 (**B**) und 0,1 (**C**) infiziert wurden.

### **5.6.6 Zytotoxizität des adenoviralen Vektors Ad MLP F&H auf HER-911-Zellen in einem bi-dimensionalen Modell**

Um den Einfluss der unter MLP-Promoter gesteuerten Fusion auf die Zytotoxizität von 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren zu untersuchen, wurden die Zellzerstörungsfähigkeiten von Ad MLP F&H, Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal miteinander verglichen. Dementsprechend wurden am Vortag 200 000 HER-911-Zellen in 10 12-Loch-Platten ausgesät. Für dieses Experiment wurde in jede Platte nur die erste Vier-Löcherreihe mit Zellen besetzt. Am nächsten Tag wurde von der gesamten Plattenmenge eine Hälfte mit Ad CMV F&H, Ad MLP F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal mit einer m.o.i.=10 und die andere Hälfte mit einer m.o.i.=1 infiziert. Alle 24 Stunden wurde von beiden Gruppen jeweils eine Platte fixiert und mit Kristall-Violett gefärbt. Die gefärbten Platten wurden anschließend mit der Hilfe eines Scanners fotografiert (Abb. 5.31).

Verglichen mit dem fusionsfähigen Vektor, Ad CMV F&H, fällt auf, dass die verzögerte Expression der Fusionsproteine und die darauffolgende Induktion der Zellfusion die Zellzerstörungseffizienz des Vektors Ad MLP F&H nicht beeinträchtigen. Sowohl Ad CMV F&H als auch Ad MLP F&H zeigen bei zwei verschiedenen m.o.i.'s eine vergleichbare Zytotoxizität (Abb. 5.31 A und B), die jene von Ad CMV  $\beta$ Gal deutlich übertreffen kann. Somit können diese Vektoren durch Expression von F- und H-Protein in der späten Phase der Adenovirus-Replikation, so wie Ad CMV F&H, eine effiziente Zytotoxizität erzielen.



**Abb. 5.31: Zytotoxizität der adenoviralen Vektoren *Ad CMV F&H*, *Ad MLP F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* auf HER-911-Zellen in einem bi-dimensionalen Modell. Einfluß der unter MLP-Promoter gesteuerten Fusion auf die Zytotoxizität von 1<sup>st</sup>- Generation Vektoren.** 200 000 HER-911-Zellen wurden am Vortag in 10 12-Loch-Platten ausgesät. Für dieses Experiment wurde in jede Platte nur die erste Vier-Löcherreihe mit Zellen besetzt. Am nächsten Tag wurde von der gesamten Plattenmenge eine Hälfte mit *Ad CMV F&H*, *Ad MLP F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* jedes Mal bei einer m.o.i.=10 und die andere bei einer m.o.i.=1 infiziert. Alle 24 Stunden wurde von beiden Gruppen jeweils eine Platte mit Kristall-Violett fixiert und gefärbt. **A** Anteil der bei m.o.i.=10 infizierten HER-911-Zellen. **B** Anteil der bei m.o.i.=1 infizierten HER-911-Zellen.

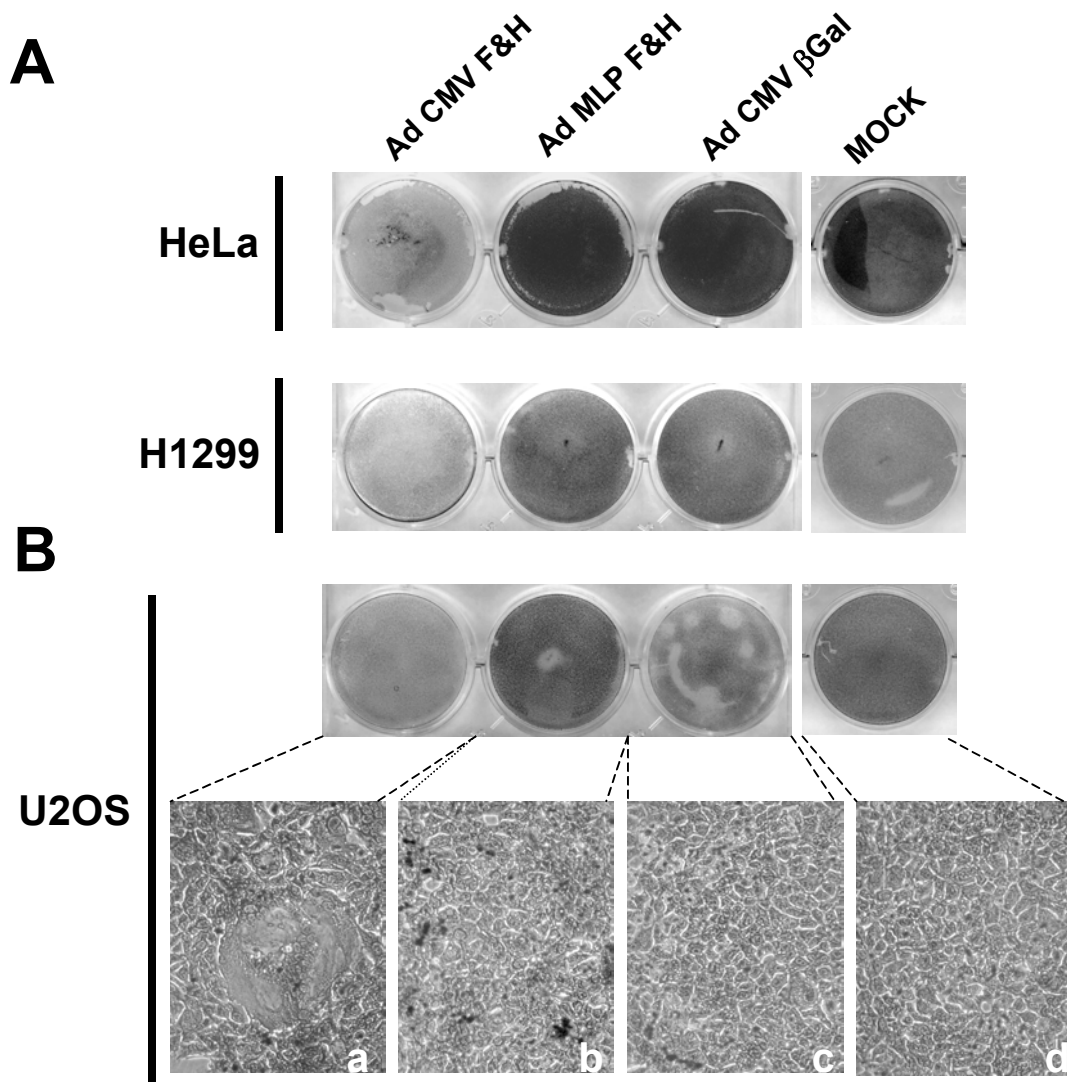
### **5.6.7 Untersuchung der Fusionsaktivität von 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren in Abwesenheit adenoviraler Replikation**

Die Herstellung eines adenoviralen Vektors, der zur Verbesserung der Zytotoxizität die Fusionsproteine unter der Kontrolle eines MLP-Promoters exprimiert, hatte als Ziel, die Expression dieser zytotoxischen Produkte nur im Rahmen einer aktiven adenoviralen Replikation voranzutreiben. Auf diese Art soll die Expression der Fusionsproteine nur im Kontext der adenoviralen Replikation stattfinden.

Um diese von der Replikation abhängige F- und H-Protein-Expression nachweisen zu können, wurden nicht-permissive Zellen mit beiden fusionsfähigen Vektoren (Ad CMV F&H und Ad MLP F&H) oder mit dem nicht-fusionsfähigen Ad CMV  $\beta$ Gal-Vektor infiziert. Der Zweck dieser Untersuchung ist festzustellen, ob die Expression von Fusionsproteinen unter der Kontrolle des späten Promoters in Abwesenheit von adenoviraler Replikation erfolgen kann.

Für dieses Experiment wurden am Vortag parallel in 12-Loch-Platten jeweils 200 000 Zellen von drei verschiedenen Zelllinien -nämlich Hela, H1299 und U2OS- ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellansätze mit Ad CMV F&H, Ad MLP F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal jedesmal bei einer m.o.i. von 0,5 infiziert und dann mit normalem DMEM-FCS weiter inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit Kristall-Violett fixiert und gefärbt. Die entsprechenden fixierten Platten wurden danach auf einem Scanner fotografiert und in Abbildung 5.32 zusammengestellt. Da die Morphologie und Integrität der U2OS-Zellen nicht großflächig beeinträchtigt war, wurden diese Zellrasen unter Licht-Mikroskop mit Phasenkontrast beobachtet (Abb. 5.32 a,b,c,d).

Die unspezifische Expression der Fusionsproteine von dem Ad CMV F&H-Vektor führt unmittelbar zur Entstehung von Synzytien (Abb. 5.32 B, a) und einer darauffolgenden Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen, die mit Ad MLP F&H transduziert wurden, keine zytopathischen Effekte, die mit der Entstehung einer Fusionsaktivität zusammenhängen könnten (Abb. 5.32 B, b). Jene Zellrasen, die mit dem Ad CMV  $\beta$ Gal-Vektor transduziert wurden, waren weitgehend intakt. Hierdurch wird bestätigt, dass die Induktion der Fusion von dem Ad MLP Vektor in Abwesenheit von Replikation nicht erfolgt. Somit kann die Expression der Fusionsproteine und ihre darauffolgende zytotoxische Wirkung durch die Verwendung eines MLP-Promoters von der Replikation abhängig gemacht werden.



**Abb. 5.32: Zytotoxizität der adenoviralen Vektoren *Ad CMV F&H*, *Ad MLP F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* in drei nicht-permissiven Zelllinien: *HeLa*, *H1299* und *U2OS*. Untersuchung der Fusionsaktivität von 1<sup>st</sup>. Generations-Vektoren in Abwesenheit von adenoviraler Replikation.** Für dieses Experiment wurden am Vortag parallel in 12-Loch-Platten jeweils 200 000 Zellen von drei verschiedenen Zelllinien -Hela, H1299 und U2OS- ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellansätze mit *Ad CMV F&H*, *Ad MLP F&H* und *Ad CMV  $\beta$ Gal* jedesmal bei einer m.o.i. von 0,5 infiziert und dann mit normalem DMEM-FCS weiterinkubiert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit Kristall-Violett gefärbt. Die Zellrasen von U2OS-Zellen wurden unter Licht-Mikroskop mit Phasenkontrast beobachtet (**a,b,c,d**). **A** Dargestellt sind die fixierten Zellrasen der transduzierten HeLa- (oben) und H1299-Zellen (unten). Die Kristall-Violett-Färbung der transduzierten U2OS-Zellrasen und ihre entsprechenden Fotoaufnahmen sind in Teil **B** gezeigt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Herstellung fusionsfähiger adenoviraler 1<sup>st</sup>Generations-Vektoren, die die Masernvirus-Proteine F und H exprimieren

Die Fusion von Zellen schädigt ihre Funktionen. Nicht nur die Struktur der Zellen und die Organisation ihres Zyto-Skeletts wird verändert (*Ghosh et al., 1998; Bateman et al., 2000*), sondern auch der mitochondriale Metabolismus versagt. Dadurch tritt eine Depletion des ATPs ein und die Zellen sterben (*Higuchi et al., 2000*). Diese Tatsache hat die bisherige Herstellung von fusionsfähigen Adenoviren beschränkt. Die Ausbeute der Viren aus den *Packaging-Zellen* wird durch die Fusion erheblich verschlechtert.

Strategien zur Herstellung fusionsfähiger Viren (Adeno- oder Retroviren) wurden beschrieben, wobei entweder die *Packaging-Zellen* keine spezifischen Rezeptoren für die in dem Virus kodierten Fusionsproteine an ihren Oberflächen exprimieren (*Dewar et al., 1989*), oder sie stammen einer anderen Tierart ab (z.B. Raten, Mäuse), wie bei Erzeugung von onkolytischen Retroviren (*Diaz et al., 2000*). So wird die Entstehung von Viren in Abwesenheit von Fusion möglich.

Replikation und Entstehung von humanen Adenoviren sind jedoch nur in humanen Zellen möglich. Darüber hinaus benötigt die Herstellung von 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren die zelluläre Expression der adenoviralen E1A- und E1B-Proteine, damit die Entstehung der Viruspartikel gewährleistet wird (*He et al., 1998*).

Adenovirale Vektoren, die die Masernvirus F- und H-Proteine gleichzeitig exprimieren, wurden bisher nicht hergestellt, jedoch andere, die nur für ein einziges Protein – entweder F- oder H- kodieren (AdH und AdF) (*Galanis et al., 2001*). So wird die Applikation dieser Vektoren im Verlauf der Virusentstehung nicht zur Fusion führen, weil die F- und H-Proteine an der Zelloberfläche gleichzeitig exprimiert werden müssen, um die Verschmelzung der Zellmembranen auslösen zu können (*Caballero et al., 1998; Morrison et al., 1991; Bousse et al., 1994; Bagai et al., 1995; Ward et al., 1995; Hernandez et al., 1996*). Diese Vektoren exprimieren nur bei einer Koinfektion F- und H-Protein gleichzeitig, und nur dann kommt es zur Fusion der infizierten Zellen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Entstehung adenoviraler 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren im Rahmen einer starken Fusionsaktivität erfolgen kann. Adenovirale Plasmide, die unter einem CMV-Promoter die Masern-Fusionsproteine F und H stark exprimieren, führen wenige Stunden nach Beginn der Transfektion unmittelbar zur



Fusion bzw. Destruktion des Zellrasens. Ungeachtet dieses zytopathischen Effekts wurden Viruspartikel innerhalb dieser fusionierten Zellstrukturen mit Erfolg hergestellt (Abschnitt 5.1.1). Allerdings kann die Zugabe von fusionsinhibierenden Peptiden (FIP) die Virusausschüttung dieser Vektoren erheblich (circa eine Log-Stufe) verbessern. Eine mögliche Begründung dieses besseren Resultats wird darin gesehen, dass die von der Fusion ausgehende Zytotoxizität die Überlebenschancen der transfizierten Zellen verringert und auf Grund dessen die Virusentstehung beeinträchtigt. Trotzdem kann eine weitere Passage dieser Virussuspension die Präparation eines Virusstocks hohen Titer ermöglichen.

Anders sieht die Herstellung von jenen fusionsfähigen Vektoren aus, welche die Fusionsproteine unter der Kontrolle des MLP-Promoters exprimieren. Durch die in dieser Doktorarbeit bewiesene späte Aktivierung des MLP-Promoters wird die Expression der Fusionsproteine in den Stunden der Virusherstellung temporär verzögert und dadurch die frühe Zerstörung des transfizierten Zellrasens vermieden. Somit gestaltet sich die Entstehung dieser Vektoren als leichter. Die Expression der Fusionsproteine und die darauffolgende Verschmelzung der Zellmembranen erfolgen erst, wenn die adenovirale DNA-Replikation begonnen hat (Abschnitt 5.6). Auf diese Art werden die transfizierten Zellen vor einer frühen Fusion geschützt. Die Verzögerung bei der Auslösung zytopathischer Effekte, nämlich der Fusion, ist für die effiziente Entstehung der Viruspartikel förderlich. Ein interessantes technisches Verfahrensdetail, dass für den Erfolg dieser Virusherstellung kritisch ist, besteht wahrscheinlich in den DNA-Mengen des Plasmids *pAd1 CMV F&H*, die zur Transfektion verwendet wurden bzw. in der Größe des Zellansatzes. Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde festgestellt, dass im Rahmen einer Transfektion zur Erzeugung fusionsfähiger Vektoren die Verwendung von großen DNA-Mengen (mehr als 4 µg auf einen 200 000 HER-911-Zellansatz) die Entstehung von Viruspartikeln verhindert. Im Gegensatz dazu wurde die Verwendung von kleineren Mengen, wie 2,5 µg je 200 000 HER-911-Zellansatz, mit der Entstehung der Ad CMV F&H-Vektoren als kompatibel beobachtet und ebenfalls eine ausreichende Transfektionseffizienz erreicht. Die Berücksichtigung dieses technischen Details könnte für die Herstellung anderer fusionsfähiger Vektoren sehr hilfreich sein.

## 6.2 Zytotoxizität und Replikation fusionsfähiger Vektoren: Vorschläge zu einer möglichen Anwendung

Die Erzielung einer effizienteren Zytotoxizität ist eines der Hauptziele der Entwicklung neuer adenoviraler Vektoren zur Tumorthherapie. Zur Zeit wird die Effizienz von onkolytischen Adenoviren in verschiedenen klinischen Studien untersucht. Das Virus ONYX-015 (dl 1520) (*Barker & Berk, 1997; Bischoff et al., 1996*) wurde bisher für ein breites Spektrum von Tumoren verwendet und wird in Phase-II-Studien als Alternative zur Behandlung von inoperablen Tumormassen weiter untersucht (*Heise et al., 1997; Heise et al., 1999; Ganly et al., 2000; Neumanatis et al., 2000; Neumanaitis et al., 2001; Lamont et al., 2000; Mulvihill et al., 2001*). Aus der Betrachtung der Ergebnisse dieser klinischen Erfahrungen heraus ergibt sich, dass die Effizienz und Tumorausbreitung dieser onkolytischen Adenoviren von einem optimalen Ergebnis weit entfernt sind. Adenoviren breiten sich nur wenige Millimeter von dem Stichkanal aus. In anderen Versuchen, in welchen die Virustherapie von systemischen Zytostatika begleitet wurde, wurde den Patienten sogar mehrfach Virus injiziert (*Khuri et al., 2000; Ganly et al., 2000*). Daraufhin wurden diese therapierten Tumoren durch Computertomographie untersucht und in Quadranten eingeteilt. Dann wurde in alle Quadranten Virus appliziert (*Ganly et al., 2000*). Bei anderen Tumoren ist eine multiple Verabreichung von Viren jedoch nicht möglich, da der Zugang zu aufwändig ist. Eine mehrfache und intensive Verabreichung der Viren durch multiple Injektionen stellt dann u.U. ein hohes Risiko für das Leben der Patienten dar.

Die endoskopischen Verfahren trugen einen großen Teil zum Fortschritt der Diagnose und Therapie gastrointestinaler Krankheiten bei. Sie stellen ebenfalls einen wichtigen Ansatz zur Therapie des Pankreaskarzinoms dar. Mit einem mit Injektionsanlage ausgestatteten Endoskop und der Anwendung eines Ultraschall-Transduktors können im Bereich des Magens bzw. Zwölffingerdarms Tumormassen lokalisiert, eingeschätzt und mit einer Virussuspension therapiert werden. In diesen Fällen ist eine mehrfache Verabreichung der Viren technisch so kompliziert, dass es erforderlich wäre, Vektoren zu verwenden, die sich nach einmaliger Injektion effizient ausbreiten können. Trotz dieser Tatsache wurden kürzlich Verfahren dieser Art mit dem ONYX-015-Vektor weiterentwickelt (*Hecht et al., 2003*). Aus der Betrachtung der bereits publizierten Ergebnisse leitet sich die Folgerung ab, dass nicht nur die Risiken einer Zwölffingerdarm-Perforation, sondern auch jene hinsichtlich einer resultierenden Sepsis im Verlauf dieser Anwendung entstehen. Darüber hinaus wurde in diesen Studien keine relevante Regression der therapierten Pankreastumormassen erreicht.

Infolgedessen spielt die Entwicklung neuer wirksamer Vektoren im Rahmen dieser innovativen Behandlungsarten eine relevante Rolle. Das Ziel dabei ist es, Viren herzustellen, die auf Grund ihrer Effizienz eine verbesserte Zerstörungsfähigkeit und Ausbreitung in dem Tumor erzielen können.

In dieser Doktorarbeit wurde bewiesen, dass die Nutzung von Fusionsfähigkeiten der entsprechenden adenoviralen Vektoren zu einer bedeutsamen Steigerung ihrer Zytotoxizität führen kann.

Die Ad CMV F&H und Ad MLP F&H Vektoren sind in der Lage, beide Masernvirus-Fusionsproteine (F und H) gleichzeitig zu exprimieren. Bisher sind 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren dieser Art weder hergestellt noch charakterisiert worden. Auf diese Art wird die Synthese beider Fusionsproteine von einem einzigen Vektor vorangetrieben und dadurch die Umständlichkeiten einer Koinfektion mit F- und H-Protein exprimierenden Vektoren vermieden (*Galanis et al., 2001*).

Diese bedeutende Fusionsaktivität wird, abgesehen von dem Ausmaß der Infektion (verwendete m.o.i.), die Replikationsfähigkeiten dieser Vektoren nicht beeinträchtigen. Sowohl der fusionsfähige Vektor Ad CMV F&H als auch ein nicht-fusionsfähiger, Ad CMV  $\beta$ Gal, haben keine Unterschiede in ihrer Replikationsfähigkeit im Verlauf der komparativen Untersuchungen gezeigt (Abschnitt 5.2.3). Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit denen einer ehemaligen Publikation überein, in welcher replikationsfähige Vektoren die für HIV-env-Protein kodieren, im Rahmen fusionsinduzierender und nichtfusionsinduzierender Bedingungen untersucht wurden (*Li et al., 2001*).

Niedrigere Replikationsleistungen wurden von Ad MLP F&H erreicht. Dieser Vektor zeigte eine eindeutig schlechte Replikation im Vergleich zu Ad CMV F&H und Ad CMV  $\beta$ Gal (Abschnitt 5.6.5). Obwohl die Ursache dieser schlechten Leistung in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, kann vermutet werden, dass die Anwesenheit von zwei MLP-Promotoren in dem adenoviralen Genom zur Entstehung einer Kompetition ihrer Trans-Aktivierung führen könnte. Die Faktoren zur Aktivierung der adenoviralen späten Transkription (Iva2, IX, etc.) werden von beiden MLP-Promotoren gleichzeitig benötigt. Somit könnte eine Konkurrenz um diese Faktoren entstehen und dadurch eine Interferenz ihrer Aktivitäten eintreten, die sich in einer schlechten Replikationsfähigkeit zeigen könnte. Die Bestätigung dieser Hypothese verlangt eine Charakterisierung der adenoviralen Aktivität in der späten Phase ihres Zyklus (Transkription und Synthese adenoviraler Produkte). Ungeachtet dessen hat Ad MLP F&H eine höhere Zytotoxizität im Vergleich zu Ad CMV  $\beta$ Gal gezeigt und sie ist jener von Ad CMV F&H ähnlich (Abschnitt 5.6.6).

Wie im Ergebnissteil schon beschrieben, wurde auch im Rahmen einer Koinfektion mit replikationsfähigen Adenoviren nicht die Replikationsfähigkeit dieser Kombinationen verschlechtert. In diesem Sinne hat ein replikationsfähiges Adenovirus (*dl 309*), das zusammen mit fusionsfähigen Vektoren eingesetzt wurde, im Vergleich zu einer Kombination mit nicht-fusionsfähigen Vektoren ähnliche Replikations-Parameter erreicht (Abschnitt 5.3.1). Dies spricht dafür, dass ein therapeutischer Einsatz eine Kombination aus replikationsfähigen Adenoviren und fusionsfähigen Vektoren sinnvoll ist. Ohne die globale Replikationsfähigkeit des Ansatzes zu verschlechtern, könnte eine Kombination mit fusionsfähigen Vektoren die Zytotoxizität erheblich steigern. Bei Anwendungen dieser Art können konditional-replizierende Adenoviren eingesetzt werden. Dies erhöht die Sicherheit, da die fusionsfähigen Vektoren nur aktiv werden, wenn die replikationsfähigen Viren auf Tumoren treffen. Modelle dieser Art wurden bisher weder in anderen Veröffentlichungen vorgeschlagen noch experimentell angewendet. In diesem Zusammenhang sollte auch die Promoter-Aktivität zur Expression der Fusionsproteine berücksichtigt werden; unspezifische Promotoren können bereits zu einer unabhängigen, ungesteuerten Synthese jener Produkte führen und somit den Befall des normalen Gewebes verursachen. Diese Arbeit hat jedoch gezeigt, dass fusionsfähige 1<sup>st</sup> Generations-Vektoren, die ihre Transgene unter dem MLP-Promoter exprimieren, in Abwesenheit von adenoviraler Replikation keine unmittelbare Zytotoxizität in nicht-permissiven Zellen auslösen (Abschnitt 5.6.7).

### **6.3 Die adenovirale Replikation in Synzytien: Einfluss der Fusion auf die Aktivität adenoviraler Vektoren**

Neben der Charakterisierung der Replikation bzw. Zytotoxizität fusionsfähiger Adenoviren sind andere Fragen im Hinblick auf die Molekularbiologie adenoviraler Vektoren im Kontext der Zellfusion weiterhin offengeblieben. So bleibt zu klären, wie Adenoviren im Rahmen einer zytotoxischen Aktivität, nämlich der Fusion, ihre Replikationsfähigkeiten behalten. Die Aktivität von Adenoviren im Kontext einer Zellfusion wurde bereits in einer früheren Studie untersucht (*Li et al., 2001*). Auch dort wurde gezeigt, dass die von rekombinanten Adenoviren induzierte Fusion keinen beeinträchtigenden Einfluss auf die Luziferase-Transgen-Expression von einem anderen rekombinanten Vektor hat. Diese Ergebnisse wurden in dieser Doktorarbeit unter anderen Bedingungen bestätigt. Fusionsfähige Vektoren, die Masernvirusproteine F und H exprimieren, haben im Verlauf einer fusionsinduzierenden Infektion die Transgen-Expression anderer Luziferase-exprimierender Vektoren nicht alteriert (Abschnitt 5.4.2). Ansonsten wurde bisher die Biologie der Adenoviren in Synzytien noch

nicht untersucht. Es ist bis heute noch nicht klar, wie die Fusion die molekularen Ereignisse der adenoviralen Replikation beeinflusst; weder Untersuchungen hinsichtlich der genomischen Replikation, noch hinsichtlich der Synthese adenoviraler Proteine wurden bisher unter Fusionsbedingungen vorgenommen.

Diese Doktorarbeit hat zur Klärung dieser Fragen beigetragen (Abschnitte 5.4.1 und 5.4.3). Es zeigte sich, dass eine effiziente adenovirale Replikation mit der Synzytienbildung kompatibel ist. Die semi-quantitative Untersuchung der genomischen Replikation adenoviraler Vektoren hat hier gezeigt, dass es keine relevanten Unterschiede bei der DNA-Replikation von fusionsfähigen und nicht-fusionsfähigen Vektoren gibt. Die DNA-Replikation von Adenoviren kann sowohl unter Fusionsbedingungen als auch unter konventionellen Bedingungen mit vergleichbarer Effizienz erfolgen. Aus dieser Beobachtung heraus ergibt sich, dass die „Replikative Maschinerie“ der Adenoviren im Kontext einer induzierten Fusion nicht alteriert wird. Das spricht dafür, dass nicht nur die Lebensfähigkeit eines replikativen Zellkerns im Synzytium vorhanden ist, sondern auch die Fähigkeit zum Import der für die Replikation essentiellen adenoviralen Faktoren bzw. Proteinen. Aus der Sicht anderer Autoren könnte eine „Kern-zu-Kern“ Ausbreitung und die darauffolgende Infektion benachbarter Kerne die Leistung dieser effizienten DNA-Replikation erklären (*Li et al., 2001*). Dieser Aussage wird in dieser Doktorarbeit wiedergesprochen.

Fusionsfähige und nicht-fusionsfähige Vektoren haben im Verlauf dieser Analyse keine Unterschiede im Vergleich ihrer genomischen Replikation und Protein-Expression gezeigt. Daraus lässt sich ebenfalls ableiten, dass innerhalb eines Synzytiums nicht nur die Transkription, sondern auch die Translation intakt bleibt. Dies spricht dafür, dass ein Synzytium die für adenovirale Replikation nötige funktionelle Integrität sowohl des Zytoplasmas als auch des Kerns, gewährleisten kann.

Ungeachtet der energetischen Depletion, unter welcher die Zellen eines Synzytiums leiden (*Higuchi et al., 2000*), können also Adenoviren mit normaler Effizienz alle molekularen Schritte ihrer Replikation erfolgreich vollziehen.

In Experimenten dieser Doktorarbeit wurde durch direkte und indirekte Beweise festgestellt, dass alle Kerne eines Synzytiums in der Lage sind, frühe und späte adenovirale Proteine zu importieren (Abschnitte 5.3.2 und 5.5.2). Daher wird vermutet, dass alle Kerne eines Synzytiums mehrere adenovirale Proteine und Faktoren importieren und somit in der Lage wären eine parallele Replikation bzw. Morphogenese von Partikeln durchführen zu können. Ob aber tatsächlich beides stattfindet, wird in dem nächsten Punkt dieser Diskussion betrachtet.

Modelle dieser Art können für die Untersuchung von Import- und Export-Signalen anderer Proteine sehr gut ausgenutzt werden. Die Verwendung dieser fusionsfähigen Vektoren bietet die Möglichkeit, den Import von Proteinen in einem replikationsaktiven Modell zu untersuchen. So könnte der Kern-Import mehrerer viraler oder zellulärer Faktoren wie bei einem Heterokaryon-Assay (*Pinol-Roma und Dreyfuss, 1992; Dobbstein et al., 1997*) untersucht werden, ohne externe Zellfusions-Reagenzien (z.B. Polyethylenglykol) zu verwenden. Andere mögliche Anwendungen dieser von adenoviralen Vektoren induzierten Fusion wären im Rahmen der Entwicklung von Techniken zur Tumorstimulation (*Morse und Lyster, 1998*) applizierbar. So würden Tumorzellen und dendritische Zellen miteinander fusionieren und somit die Erzeugung von spezifischen Antikörpern gegen Tumorepitope ermöglicht. Aus diesem Prinzip heraus ergeben sich andere interessante Applikationen, wie z.B. die Konstruktion von humanen Hybridomen (*Milstein, 1999*) bei der Fusion zwischen Lymphozyten und einer Tumorzelllinie.

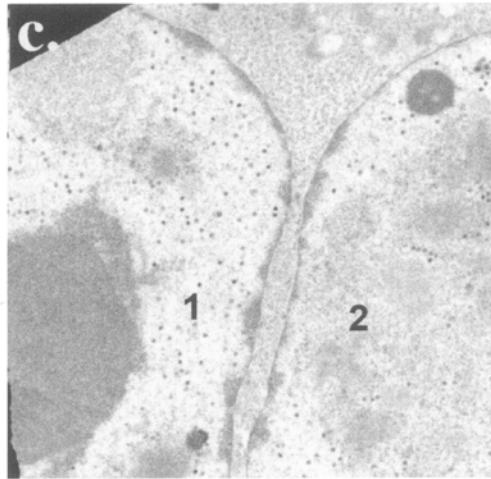
#### **6.4      Ausbreitung von Adenoviren innerhalb eines Synzytiums**

Wie bereits diskutiert, findet die adenovirale Protein-Synthese in dem gemeinsamen Zytoplasma eines Synzytiums statt und die synthetisierten Produkte werden von benachbarten Kernen dieses Synzytiums importiert. Desweiteren ist eine Translation in multiplen Bereichen dieses Synzytiums zu vermuten und dadurch eine Verteilung dieser translatierten Produkte durch das Zytoplasma zu erwarten. Diese Doktorarbeit hatte u.a. als Ziel, eine eventuelle „Kern-zu-Kern“ Virusausbreitung abzuklären, d.h., eine mögliche Virusinfektion von anderen ursprünglich nicht infizierten Kernen innerhalb eines Synzytiums zu evaluieren.

Bisher wurde diese Fragestellung noch nicht bearbeitet, und es gibt außer der Publikation von Li und Mitarbeitern (*Li et al., 2001*) keine andere Veröffentlichung, in welcher dieses Phänomen untersucht wurde. In dieser Publikation haben die Autoren die Replikation, Zell-Freisetzung, Transgen-Expression und Lokalisierung von Viruspartikeln in dem Kontext einer von fusionsfähigen Adenoviren induzierten Synzytienbildung untersucht (*Dewar et al., 1989*). Die in dieser Publikation verwendete Rekombinante exprimiert das Env-Protein des HIV-I-Virus (*Human Immunodeficiency Virus Type 1*). Um die Aktivität dieses Virus im Kontext der Fusion zu charakterisieren, wurden rekombinante HeLa-Zellen verwendet, die konstitutiv den CD4-Rezeptor exprimieren (HeLa-CD4<sup>+</sup>). Auf diese Art erfolgt eine Wechselwirkung zwischen den retroviralen Env-Proteinen und dem CD4-Rezeptor, welche eine Fusion auslöst.

Elektronenmikroskopie wurde eingesetzt, um innerhalb der Synzytien Viruspartikel in Kernen zu detektieren. Bei der Durchführung dieser Untersuchung wurden Zellrasen mit den fusionsfähigen Adenoviren bei einer sehr niedrigeren m.o.i. (etwa 0,1) infiziert .

30 Minuten nach Beginn dieser Infektion wurden die Zellrasen fixiert und für eine elektronenmikroskopische Untersuchung weiter behandelt. Unter dem Elektronenmikroskop wurden Zellen bzw. Kerne dieser mit fusionsfähigen Adenoviren infizierten Zellen untersucht und diejenige, die Viruspartikel enthielten, quantifiziert. Aus den Ergebnissen dieser Quantifizierung ergab sich, dass mehr als 65% der in den Synzytien vorhandene Kerne Viruspartikel enthalten (Abbildung 6.1).

TABLE 1. SUMMARY OF ADENOVIRUS DISPERSION IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF SYNCYTIA<sup>a</sup>

Cell	Virus	Number of nuclei counted	Number of cells in syncytia <sup>b</sup>	Number of infected cells <sup>c</sup>	Infected nuclei in syncytia <sup>d</sup>	Percentage of total nuclei infected
HeLa	Ad5Luc3	200	0	18	NA	9
HeLa-CD4 <sup>+</sup>	Ad5Luc3	200	0	15	NA	7.5
HeLa	Ad5HIVenv	300	0	24	NA	8
HeLa-CD4 <sup>+</sup>	Ad5HIVenv	300	247	195	160	65 <sup>a</sup>

Abbreviation: NA, Not applicable.

<sup>a</sup>Cells were infected with either the control virus, Ad5Luc3, or the experimental virus, Ad5HIVenv, 28 hr before fixing and preparing for electron microscopy analyses.

<sup>b</sup>Syncytia were defined as regions of multiple nuclei devoid or apparent interstitial boundaries between cells compared with the controls.

<sup>c</sup>Cells were scored positive for infection by the presence of 10 or more virus particles detected in the nucleus at  $\times 100,000$ .

<sup>d</sup>Nuclei were scored positive for infection by the presence of 10 or more virus particles detected at  $\times 100,000$ .

**Abbildung 6.1: Ergebnisse aus der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Hui Li und Mitarbeitern (Li et al., 2001)**

*Aus der Publikation: „Human Immunodeficiency Virus Type 1-Mediated Syncytium Formation Is Compatible with Adenovirus Replication and facilitates Efficient Dispersion of Viral Gene Products And De Novo-Synthesized Virus Particles”, Li et al., Human Gene Therapy 12: 2155-2165 (December 10, 2001)*

**Oben:** Fotoaufnahme (2 000 000X-Vergrößerung). Hier sind Viruspartikel in zwei benachbarten Kernen eines Synzytiums zu erkennen. **Unten:** Quantifizierung (Tabelle I). Die Infektion mit dem fusionsfähigen Vektor Ad5HIVenv auf HeLa-CD4<sup>+</sup>-Zellen ermöglicht die Bildung von Synzytien. In den restlichen drei Ansätzen ist keine Fusion zu beobachten.

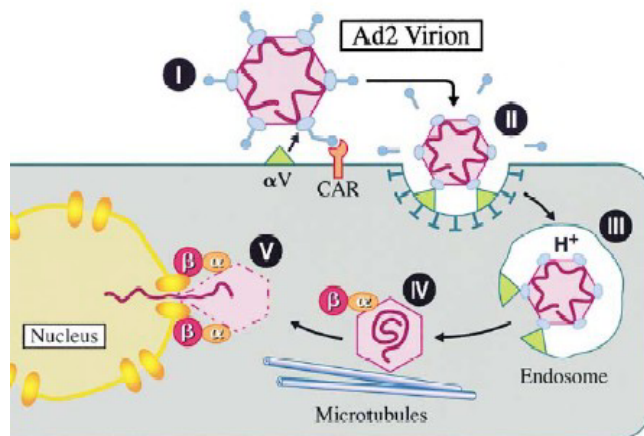
Aus der Sicht der Autoren wären Adenoviren dazu fähig, sich innerhalb eines Synzytiums auszubreiten, benachbarte Kerne zu infizieren und dort eine „de Novo-Synthese“ von Viruspartikeln voranzutreiben. Mechanismen zur Klärung dieses Phänomens wurden von den Autoren nicht untersucht bzw. vorgeschlagen. Trotzdem lässt sich aus den Erwägungen dieser Forscher ableiten, dass ein Phänomen dieser Art entweder durch eine „DNA-Kern zu Kern-Wanderung“ oder durch den Transport von neu synthetisierten Viruspartikeln zu den benachbarten Kernen erfolgen könnte. Die Argumentations-Kraft dieser Aussage besteht



lediglich in den Ergebnissen dieser mikroskopischen Untersuchung. Paradoxerweise wurde in derselben Publikation die Replikationsfähigkeit dieser fusionsfähigen Adenoviren untersucht und mit einem nicht-replikationsfähigen Vektor verglichen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass es keine Unterschiede in den Replikationsparametern beider Adenoviren gab. Ähnliche Resultate ergaben ebenfalls die Analysen dieser Doktorarbeit (Abschnitt 5.2.3). Wenn tatsächlich eine Virusausbreitung erfolgte, hätte die Replikation jener fusionsfähigen Adenoviren eine bessere Leistung gezeigt.

Darüber hinaus sind Auffassungen dieser Studie aus dem Gesichtspunkt eines Adenoviologen theoretisch umstritten. Erstens ist die mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung festgestellte Anwesenheit von Viruspartikeln aus der Sicht dieser Dissertation nicht aussagekräftig genug, um eine reale „Kern-zu-Kern“ Ausbreitung bzw. sekundäre Infektion der Kerne postulieren zu können. Wie bereits in dieser Doktorarbeit bewiesen, werden von allen Kernen eines Synzytiums sowohl frühe als auch späte adenovirale Proteine effizient importiert (Abschnitte 5.3.2, 5.5.1 und 5.5.2). Aus der Betrachtung dieses Faktums leitet sich die Schlussfolgerung ab, dass eine Morphogenese von Viruspartikeln auch in benachbarten Kernen eines Synzytiums erfolgen kann. Im Rahmen einer konventionellen Adenovirus-Infektion werden sich ständig nicht-infektiöse Viruspartikel bilden, wobei die Morphogenese der Partikel in Abwesenheit von der DNA-Enkapsidierung erfolgt. Dies stellt ein normales Ereignis der adenoviralen Replikation dar. Aus diesen Erkenntnissen heraus leitet sich ab, dass eine Bildung von „leeren“ Adenovirus-Partikeln in anderen Kernen erfolgen kann, also eine parallele Morphogenese. Infolgedessen wäre ein Auftreten von Viruspartikeln (leere, nicht-infektiöse) in den benachbarten Kernen zu erwarten. Zweitens ist die Idee einer sekundären Infektion der nebenliegenden Kerne eines Synzytiums umstritten. Es kommt nicht nur zur Freisetzung von Adenovirus-Partikeln aus einem infizierten Kern in einer sehr späten Phase der Virusinfektion, indem das adenovirale zytolytische Protein E3-11.6K (ADP) stark exprimiert wird (Tolleffson *et al.*, 1996). Auch die bisher bekannten Schritte Kern-Transport von Virus-DNA und Partikeln sind Folge einer sehr komplexen Wechselwirkung mit zellulären Strukturen und Faktoren (Cullen, 2001). Die Infektion einer Zelle mit Adenoviren beginnt mit dem Kontakt des *Adenovirus-Fiber*-Protein mit dem zellulären CAR-Rezeptor (*Coxsackie Adenovirus Receptor*) (Abbildung 6.2 (I)). Dabei ist aber eine Wechselwirkung zwischen dem Penton-Protein des Viruspartikels und einem zu der  $\alpha_V$ -Integrin-Familie ( $\alpha_V\beta_3$  und  $\alpha_V\beta_5$ ) zugehörigen Protein notwendig (Wickham *et al.*, 1993). Diese Wechselwirkung löst später die Freisetzung der Fiber-Proteine aus dem Kapsid aus und induziert folgend die Internalisierung dieses Kapsides in Endosomen durch Clathrin (II). In

diesen Vesikeln erfolgt eine Ansäuerung (*Greber et al., 1993*), welche die Konformation dieser Endosomenmembran alteriert. Die darauffolgende Ruptur dieser Membranen setzt das Viruspartikel in das Zytoplasma frei (**III**). Als ursächliche Komponente der Ruptur wurde bisher der *Intergrin-Penton-Komplex* betrachtet. Dieser Komplex induziert dann die Aktivierung einer in dem Partikel vorhandenen Protease (L3/p23). Diese Protease wird in dem Partikel selbst das Protein IV (haftet an das Chromosom im Inneren des Kapsids) spalten (*Greber et al., 1996*). Der darauffolgende Transport bis zum Kern benötigt den *Dynein-Mikrotubuli-Mechanismus* (**IV**) (*Leopold et al., 1998*) und kann von Nocodazol inhibiert werden (*Leopold et al., 2000; Mabit et al., 2002*). Das Viruspartikel wird auf diese Art die Kern-Peripherie erreichen und sich den Kern-Poren-Komplex anlagern. Es ist wichtig zu erwähnen, dass Hexon-Proteine ein *Kernlokalisierungssignal* in ihrer Sequenz enthalten. Diese Anhaftung benötigt wahrscheinlich die Rekrutierung und Funktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Importine (*Saphire et al., 2000*). Ist die Anhaftung an der Pore erfolgt, wird das Partikel abgebaut und das Genom anschließend in den Kern importiert (**V**) (*Greber et al., 1996*). Das importierte Genom trägt mehrere assoziierte Proteine, die ebenfalls Kernlokalisierungssignale enthalten.



**Abbildung 6.2:** Graphische Darstellung der molekularen Ereignisse, die zum DNA-Import während einer adenoviralen Infektion erfolgen.

Aus: *Cell*, Vol. 105, 698, June 15, 2001 „Journey to the Center of the Cell“, von Bryan Cullen

In einem Synzytium wäre eine „Kern-zu-Kern Ausbreitung“ nach diesen Erkenntnissen kompliziert. Fertige Viruspartikel werden innerhalb eines Synzytiums diesen molekularen Prozess nicht durchführen können. Weder die Internalisierung in Endosomen, noch die

Aktivierung von Proteasen zur Spaltung der mit dem Genom komplexierten Proteine würde erfolgen können.

Eine andere Hypothese könnte ebenfalls mit der Idee einer zytoplasmatischen „DNA-Wanderung“ begründet werden, wobei adenovirale Genome von einem Kern exportiert und von einem nebenliegenden dann importiert würden. Es gibt bisher keine Studien, die ein Phänomen dieser Art beschrieben haben. Im Gegensatz dazu gibt viele Mitteilungen, die eine starke Assoziation zwischen adenoviraler DNA und Kern-Matrix nachgewiesen haben (*Youngshusband & Maundrell, 1982; Youngshusband 1985; Khittoo et al., 1986; Cheng et al., 1990*).

Aus dieser Beobachtung heraus entstand unsere Suche nach klaren Hinweisen, die für eine aktive adenovirale DNA-Replikation in den benachbarten Kernen sprechen können.

Die Quantifizierung von E2A(DBP)-Replikationszentren (RZ) bietet zwar ein sehr nützliches „Hilfsmittel“ zur Untersuchung der adenoviralen DNA-Replikation, aber das Auftreten von RZ-ähnlichen Mustern in den benachbarten Kernen macht eine Überprüfung der Ergebnisse durch unabhängige Experimente notwendig. Es ist manchmal nicht klar, ob entweder diese Strukturen reale RZ darstellen oder lediglich das Fazit von zufälligen Akkumulierungen des E2A(DBP)-Proteins sind. Die Anwendung von DNA-Hybridisierungs-Methoden kann die spezifische Detektion von adenoviraler DNA ermöglichen. Somit wurden die falsch-positiven Ergebnisse der Untersuchung von E2A(DBP)-RZ vermieden und DNA-Replikation nachgewiesen. Die Replikation von Adenoviren erfolgt demnach nur in einem einzigen Kern des Synzytiums. Das bleibt der Fall im gesamten Verlauf eines Replikationszyklus. Diese Beobachtungen widersprechen der Vermutung einer möglichen „Kern-zu-Kern“ Ausbreitung der Virus-DNA und schließlich der These einer sekundären Infektion von nebenliegenden Kernen im Rahmen einer von Adenoviren induzierten Synzytienbildung. Das gelegentliche Auftreten von Synzytien, die mehr als einen DNA-positiven Kern enthielten, ist nach unserer Interpretation lediglich ein Fazit einer simultanen Infektion einer Zelle von mehreren Partikeln oder die Fusion zwischen Synzytien, die nah nebeneinander lagen.

Die Idee einer in den nebenliegenden Kernen stattfindenden Morphogenese von „leeren“ Viruspartikeln wäre die Erklärung für die von Li und Mitarbeiter (*Li et al., 2001*) publizierten Ergebnisse. Mit dieser Idee ist auch vereinbar, dass in einem Synzytium die absolute Menge von Viruspartikeln (DNA-haltige und –nicht-haltige Viruspartikeln) größer als bei einer konventionellen Infektion wäre.

## 6.5 Strategien zur Erzielung einer von der Virusreplikation abhängigen Fusion

Wesentlich für den klinisch erfolgreichen Einsatz von onkolytischen Adenoviren ist die Effizienz der Zerstörung von Tumorzellen. Nur wenn ein sehr hoher Prozentsatz der Zellen infiziert wird, kann ein Tumor beseitigt werden. Daher ist es für den therapeutischen Erfolg wesentlich, die Fähigkeit der Viren zur Vermehrung und zur Zell-Zerstörung so weit wie möglich zu steigern. Trotzdem soll ein Befall des umliegenden Normalgewebes verhindert und eine für die Tumorzellen selektive Zytotoxizität erzielt werden. Dies sollte dadurch erreicht werden, dass adenovirale Vektoren ihre zytotoxischen Transgene unter Abhängigkeit der von der Replikation induzierbaren Promotoren exprimieren.

Die Effizienz fusionsfähiger Vektoren bei der Beseitigung von Tumorzellen wurde in dieser Doktorarbeit getestet. Aus den Zytotoxizitäts-Analysen lässt sich erkennen, dass die Anwendung von adenoviralen Vektoren, die Fusionsproteine unter der Kontrolle eines CMV-Promoters exprimieren, zur effizienten Zerstörung von permissiven Zellen führt. Diese Expression von Fusionsproteinen führt allerdings auch in nicht-permissiven Zellen zur direkten Destruktion des infizierten Zellrasens (Abschnitt 5.6.7). Der CMV-Promoter ist bereits in sehr frühen Phasen der Virusinfektion aktiv und diese Aktivität ist vom Verlauf der Virusreplikation unabhängig (Abschnitt 5.6.2).

Für die potenzielle klinische Anwendung eines Vektors dieser Art könnte die Begrenzung der Fusionsaktivität ein großes Problem darstellen. So könnten normale Zellen von der Fusion erreicht und zerstört werden. Aus dieser Betrachtung heraus entstand die Idee, andere Vektoren zu klonieren, die die Expression der Fusionsproteine nur im Rahmen einer aktiven Replikation erlauben. So wurde der Vektor Ad MLP F&H kloniert, der unter der Kontrolle eines adenoviralen späten Promoters (MLP-Promoter) die Fusionsproteine F und H des Masernvirus exprimiert (Abschnitt 5.6). Dieser Promoter wird erst aktiv, wenn die Virusreplikation begonnen hat (*Thomas und Mathews, 1980*). Mit dieser Strategie wird die Expression der Fusionsproteine von dem Replikationsvorgang abhängig gemacht. Die Aktivierung dieses Promoters benötigt eine Wechselwirkung mit mehreren Faktoren, die nach dem Beginn der DNA-Replikation von dem Adenovirus stark exprimiert werden; z.B. IVa2 und IX. (*Crossland et al., 1983; Lewis et al., 1980; Binger et al., 1984; Fessler und Young, 1998; Lutz und Kedinger, 1996*). Folglich steigt die Aktivität dieses späten Promoters und die darauffolgende Expression adenoviraler später Proteine (*Brunet et al., 1987; Logan und Shenk, 1986; Lu et al., 1997; Reach et al., 1990; Reach et al., 1991*). Diese verzögerte Aktivität des MLP-Promoters wurde in dieser Arbeit im Rahmen einer Transgen-Expression untersucht (Abschnitt 5.6.1). Das Ad MLP Luc<sup>+</sup>-Virus exprimiert als Transgen, das

Luziferase-Gen, welches unter der Kontrolle des MLP-Promoters steht. Auf diese Art bestätigte sich, dass die Expression eines Transgens unter MLP-Promoter ebenfalls in der späten Phasen der Virusreplikation erfolgt. Entsprechend wiesen wir eine späte Transkription und Synthese der Fusionsproteine F und H bei dem Ad MLP F&H-Vektor in dem Kontext seiner Replikation (Abschnitte 5.6.2 und 5.6.3) nach. Genauso lässt sich ein verzögertes Auftreten der Synzytienbildung auf den Ad MLP F&H infizierten Zellrasen erkennen (Abschnitt 5.6.4).

Diese Transgen-Expressions-Steuerung ermöglicht eine von der Replikation abhängige Fusion der Zellen. Dieser Ansatz in Kombination mit anderen Strategien zur Erzielung einer in Tumorzellen selektiven Replikation könnte die zerstörende Aktivität onkolytischer Transgene effizient begrenzen. Auf diese Art könnten onkolytische Adenoviren hergestellt werden, die mit Deletionen (*Barker & Berk, 1987; Howe et al., 1990; Sauthoff et al., 2000*) bzw. Anwendung tumorspezifischer Promotoren (*Rodriguez et al., 1997; Yu et al., 1999*) die Replikation auf Tumorzellen beschränken und gleichzeitig die Expression von Fusionsproteinen oder anderen zytotoxischen Transgenen unter der Kontrolle eines replikationsabhängigen Promoters (z.B. MLP-Promoter) vorantreiben. Die Transgene zur Erhöhung der Zytotoxizität könnten in die E3-Region einkloniert werden. Die E3-Region der Adenoviren ist für die Virusreplikation nicht essentiell (*Berkner et al., 1983; Saito et al., 1985; Wold et al., 1995*) und ihre Deletion (partial oder total) ermöglicht eine Insertion von Transgenen (*Dewar et al., 1989; Hawkins & Hermiston, 2001a; Hawkins & Hermiston, 2001b; Hawkins et al., 2001*). Es wäre interessant, zu untersuchen, ob die Replikationsfähigkeit dieser Adenoviren von der Anwesenheit zweier MLP-Promotoren in ihrem Genom beeinträchtigt würde.

Eine andere Strategie besteht in einer Kombination zweier Adenoviren, in welcher die gleichzeitige Anwendung eines konditional replizierenden Adenovirus mit einem nicht-replikationsfähigen Vektor zur Therapie von Tumormassen eingesetzt werde. Die nicht-replikationsfähigen Vektoren (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>. bzw. 3<sup>th</sup>. Generations-Vektoren) sollen dabei die zytotoxischen Produkte unter der Kontrolle eines MLP-Promoters exprimieren. So sollten diese Viren dazu fähig sein, nur bei Komplementation durch das andere Adenovirus die zytotoxischen Produkte zu exprimieren und ihre eigene Replikation voranzutreiben.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Asada, T. Treatment of human cancer with mumps virus. *Cancer*. 1974 Dec; 34(6): 1907-28.
2. Babiss, L. E., H. S. Ginsberg, and J. E. Darnell, Jr. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol-Cell-Biol*. 1985 Oct; 5(10): 2552-8.
3. Bagai, S., and R. A. Lamb. Quantitative measurement of paramyxovirus fusion: differences in requirements of glycoproteins between simian virus 5 and human parainfluenza virus 3 or Newcastle disease virus. *J-Virol*. 1995 Nov; 69(11): 6712-9.
4. Bagai, S., and R. A. Lamb. Individual roles of N-linked oligosaccharide chains in intracellular transport of the paramyxovirus SV5 fusion protein. *Virology*. 1995 May 10; 209(1): 250-6.
5. Barker DD, Berk AJ Adenovirus E1B proteins are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* 1987, 156, 107-121.
6. Bateman, A., F. Bullough, S. Murphy, L. Emiliusen, D. Lavillette, F. L. Cosset, R. Cattaneo, S. J. Russell, and R. G. Vile. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer-Res*. 2000 Mar 15; 60(6): 1492-7.
7. Beltz, G. A., and S. J. Flint. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J-Mol-Biol*. 1979 Jun 25; 131(2): 353-73.
8. Berkner, K. L., and P. A. Sharp. Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic-Acids-Res*. 1983 Sep 10; 11(17): 6003-20.
9. Berkner, K. L., and P. A. Sharp. Generation of adenovirus by transfection of plasmids. *Nucleic-Acids-Res*. 1983 Sep 10; 11(17): 6003-20.
10. Bett A.J., Prevec L., Graham F.L., Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol*. 1993 Oct; 67 (10): 5911-21.
11. Binger, M. H., and S. J. Flint. Accumulation of early and intermediate mRNA species during subgroup C adenovirus productive infections. *Virology*. 1984 Jul 30; 136(2): 387-403.
12. Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, and F. McCormick. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 1996 Oct 18; 274(5286): 373-6.
13. Bousse, T., T. Takimoto, W. L. Gorman, T. Takahashi, and A. Portner. Regions on the hemagglutinin-neuraminidase proteins of human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion. *Virology*. 1994 Nov 1; 204(2): 506-14.

14. Brough, D. E., A. Lizonova, C. Hsu, V. A. Kulesa, and I. Kovesdi. A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J-Virol.* 1996 Sep; 70(9): 6497-501.
15. Brunet, L. J., L. E. Babiss, C. S. Young, and D. R. Mills. Mutations in the adenovirus major late promoter: effects on viability and transcription during infection. *Mol-Cell-Biol.* 1987 Mar; 7(3): 1091-100.
16. Burgert, H. G., and J. H. Blusch. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus-Genes.* 2000; 21(1-2): 13-25.
17. Caballero, M., J. Carabana, J. Ortego, R. Fernandez-Munoz, and M. L. Celma. Measles virus fusion protein is palmitoylated on transmembrane-intracytoplasmic cysteine residues which participate in cell fusion. *J-Virol.* 1998 Oct; 72(10): 8198-204.
18. Cathomen, T., B. Mrkic, D. Spehner, R. Drillien, R. Naef, J. Pavlovic, A. Aguzzi, M. A. Billeter, and R. Cattaneo. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO-J.* 1998 Jul 15; 17(14): 3899-908.
19. Cathomen, T., H. Y. Naim, and R. Cattaneo. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J-Virol.* 1998 Feb; 72(2): 1224-34.
20. Cocks, B. G., et al.. A novel receptor involved in T-cell activation. 1995. *Nature*; 376: 260-263.
21. Crossland, L. D., and H. J. Raskas. Identification of adenovirus genes that require template replication for expression. *J-Virol.* 1983 Jun; 46(3): 737-48.
22. Cullen, B. R. Journey to the center of the cell. *Cell.* 2001 Jun 15; 105(6): 697-700.
23. Dewar, R. L., V. Natarajan, M. B. Vasudevachari, and N. P. Salzman. Synthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins encoded by a recombinant human adenovirus. *J-Virol.* 1989 Jan; 63(1): 129-36.
24. Diaz, R. M., A. Bateman, L. Emiliusen, A. Fielding, D. Trono, S. J. Russell, and R. G. Vile. A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy. *Gene-Ther.* 2000 Oct; 7(19): 1656-63.
25. Dobbelsstein, M., J. Roth, W. T. Kimberly, A. J. Levine, and T. Shenk. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO-J.* 1997 Jul 16; 16(14): 4276-84.
26. Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993 Oct 22; 75(2): 295-305.
27. Enders, J. F. Bell, J. A., H., D. J. & al., e. „Adenovirus“: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 1956; 124, 119-120.
28. Engel, D. A., S. Hardy, and T. Shenk. cAMP acts in synergy with E1A protein to activate transcription of the adenovirus early genes E4 and E1A. *Genes-Dev.* 1988 Dec; 2(12A): 1517-28.

29. Erlenfofer, C., Duprex, w.p., Rima, B.K., Ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, J. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol.* 2002; 83, 1431-6.
30. Fallaux, F. J., O. Kranenburg, S. J. Cramer, A. Houweling, H. Van-Ormondt, R. C. Hoeben, and A. J. Van-Der-Eb. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum-Gene-Ther.* 1996 Jan 20; 7(2): 215-22.
31. Fessler, S. P., and C. S. Young. Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection. *J-Virol.* 1998 May; 72(5): 4049-56.
32. Fielding, A. K.; Chapel-Fernandes, S., Chadwick, M. P., Bullough, F. J., Cosset, F.L., & Russell, S.L. A hyperfusogenic gibbon ape leukemia envelope glycoprotein: Targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Hum-Gene-Ther* 2000; 11, 817-826.
33. Fields, B. N. "Virology", 3 Ed. pp. 2111-2148. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
34. Forestell, S. P., J. S. Dando, J. Chen, P. de-Vries, E. Bohnlein, and R. J. Rigg. Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene-Ther.* 1997 Jun; 4(6): 600-10.
35. Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1990 Jun; 87(12): 4650-4.
36. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 1993 Nov 1;53(21):5274-83.
37. Galanis, E., A. Bateman, K. Johnson, R. M. Diaz, C. D. James, R. Vile, and S. J. Russell. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum-Gene-Ther.* 2001 May 1; 12(7): 811-21.
38. Ganly, I., D. Kirn, G. Eckhardt, G. I. Rodriguez, D. S. Soutar, R. Otto, A. G. Robertson, O. Park, M. L. Gulley, C. Heise, D. D. Von-Hoff, S. B. Kaye, and S. G. Eckhardt. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin-Cancer-Res.* 2000 Mar; 6(3): 798-806.
39. Ganly, I., V. Mautner, and A. Balmain. Productive replication of human adenoviruses in mouse epidermal cells. *J-Virol.* 2000 Mar; 74(6): 2895-9.
40. Ganly, I., D. Kirn, G. Eckhardt, G. I. Rodriguez, D. S. Soutar, R. Otto, A. G. Robertson, O. Park, M. L. Gulley, C. Heise, D. D. Von-Hoff, S. B. Kaye, and S. G. Eckhardt. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin-Cancer-Res.* 2000 Mar; 6(3): 798-806.
41. Gao, G. P., R. K. Engdahl, and J. M. Wilson. A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum-Gene-Ther.* 2000 Jan 1; 11(1): 213-9.



42. Ghosh, J. K., and Y. Shai. A peptide derived from a conserved domain of Sendai virus fusion protein inhibits virus-cell fusion. A plausible mode of action. *J-Biol-Chem.* 1998 Mar 27; 273(13): 7252-9.
43. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J-Gen-Virol.* 1977 Jul; 36(1): 59-74.
44. Graves, M. C., S. M. Silver, and P. W. Choppin. Measles virus polypeptides synthesis in infected cells. *Virology.* 1978 May 1; 86(1): 254-63.
45. Greber, U. F., M. Willetts, P. Webster, and A. Helenius. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell.* 1993 Nov 5; 75(3): 477-86.
46. Greber, U. F., P. Webster, J. Weber, and A. Helenius. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO-J.* 1996 Apr 15; 15(8): 1766-77.
47. Grote, D., S. J. Russell, T. I. Cornu, R. Cattaneo, R. Vile, G. A. Poland, and A. K. Fielding. Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice. *Blood.* 2001 Jun 15; 97(12): 3746-54.
48. Hardy, S., and T. Shenk. E2F from adenovirus-infected cells binds cooperatively to DNA containing two properly oriented and spaced recognition sites. *Mol-Cell-Biol.* 1989 Oct; 9(10): 4495-506.
49. Hawkins, L. K., L. Johnson, M. Bauzon, J. A. Nye, D. Castro, G. A. Kitzes, M. D. Young, J. K. Holt, P. Trown, and T. W. Hermiston. Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the 6.7 K/gp19 K region. *Gene-Ther.* 2001 Aug; 8(15): 1123-31.
50. Hawkins, L. K., and T. W. Hermiston. Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the ADP region. *Gene-Ther.* 2001 Aug; 8(15): 1132-41.
51. Hawkins, L. K., and T. Hermiston. Gene delivery from the E3 region of replicating human adenovirus: evaluation of the E3B region. *Gene-Ther.* 2001 Aug; 8(15): 1142-8.
52. He, T. C., S. Zhou, L. T. da-Costa, J. Yu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1998 Mar 3; 95(5): 2509-14.
53. Hecht, J. R., R. Bedford, J. L. Abbruzzese, S. Lahoti, T. R. Reid, R. M. Soetikno, D. H. Kirn, and S. M. Freeman. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin-Cancer-Res.* 2003 Feb; 9(2): 555-61.
54. Heise, C., A. Sampson-Johannes, A. Williams, F. McCormick, D. D. Von-Hoff, and D. H. Kirn. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat-Med.* 1997 Jun; 3(6): 639-45.
55. Heise, C. C., A. M. Williams, S. Xue, M. Propst, and D. H. Kirn. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer-Res.* 1999 Jun 1; 59(11): 2623-8.

56. Heise, C. C., A. Williams, J. Olesch, and D. H. Kirn. Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer-Gene-Ther.* 1999 Nov-Dec; 6(6): 499-504.
57. Hernandez, L. D., L. R. Hoffman, T. G. Wolfsberg, and J. M. White. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu-Rev-Cell-Dev-Biol.* 1996; 12: 627-61.
58. Higuchi, H., S. F. Bronk, A. Bateman, K. Harrington, R. G. Vile, and G. J. Gores. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer-Res.* 2000 Nov 15; 60(22): 6396-402.
59. Hilleman, M. R. & Werner, J. H. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954; 83, 183- 188.
60. Hirano, A., M. Ayata, A. H. Wang, and T. C. Wong. Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding. *J-Virol.* 1993 Apr; 67(4): 1848-53.
61. Howe, J. A., J. S. Mymryk, C. Egan, P. E. Branton, and S. T. Bayley. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1990 Aug; 87(15): 5883-7.
62. Huang, R. T., E. Dietsch, and R. Rott. Further studies on the role of neuraminidase and the mechanism of low pH dependence in influenza virus-induced membrane fusion. *J-Gen-Virol.* 1985 Feb; 66 ( Pt 2): 295-301.
63. Huang, Z. X. [Studies on viral immunotherapy of ascitic tumors in mice. II. Preliminary studies on the mechanism of treatment of S 180 ascitic tumors in mice by PR8 strain of influenza virus]. *Zhonghua-Zhong-Liu-Za-Zhi.* 1985 Sep; 7(5): 332-4.
64. Hunter, E., & Swanstrom, R. Retrovirus envelope glycoproteins. 1990. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 157: 187-253.
65. Javier, R., and T. Shenk. Mammary tumors induced by human adenovirus type 9: a role for the viral early region 4 gene. *Breast-Cancer-Res-Treat.* 1996; 39(1): 57-67.
66. Jones, N. C. Multifunctional products of the adenovirus E1A gene. In "Malignant Transformation by DNA viruses", pp. 87-113. Edited by W. Doerfler & P.Böhm. Weinheim: VCH.
67. Khittoo, G., L. Delorme, C. V. Dery, M. L. Tremblay, J. M. Weber, V. Bibor-Hardy, and R. Simard. Role of the nuclear matrix in adenovirus maturation. *Virus-Res.* 1986 Jun; 4(4): 391-403.
68. Khuri, F. R., J. Nemunaitis, I. Ganly, J. Arseneau, I. F. Tannock, L. Romel, M. Gore, J. Ironside, R. H. MacDougall, C. Heise, B. Randlev, A. M. Gillenwater, P. Bruso, S. B. Kaye, W. K. Hong, and D. H. Kirn. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat-Med.* 2000 Aug; 6(8): 879-85.

69. Koch, P., J. Gatfield, C. Lober, U. Hobom, C. Lenz-Stoppler, J. Roth, and M. Dobbstein. Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer-Res.* 2001 Aug 1; 61(15): 5941-7.
70. Lamont, J. P., J. Nemunaitis, J. A. Kuhn, S. A. Landers, and T. M. McCarty. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann-Surg-Oncol.* 2000 Sep; 7(8): 588-92.
71. Lang, F.F., Fuller, G.N., Prados, M., & Yung, W.A. Preliminary results of a Phase I clinical trial of adenovirus mediated p53 gene therapy for recurrent gliomas. *Biological studies. Program/Proceeding Am Soc Clin Oncol. ASCO*; 19, 455.
72. Leopold, P. L., B. Ferris, I. Grinberg, S. Worgall, N. R. Hackett, and R. G. Crystal. Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum-Gene-Ther.* 1998 Feb 10; 9(3): 367-78.
73. Leopold, P. L., G. Kreitzer, N. Miyazawa, S. Rempel, K. K. Pfister, E. Rodriguez-Boulan, and R. G. Crystal. Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum-Gene-Ther.* 2000 Jan 1; 11(1): 151-65.
74. Lewis, J. B., H. Esche, J. E. Smart, B. W. Stillman, M. L. Harter, and M. B. Mathews. Organization and expression of the left third of the genome of adenovirus. *Cold-Spring-Harb-Symp-Quant-Biol.* 1980; 44 Pt 1; 493-508.
75. Lewis, J. B., and M. B. Mathews. Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products. *Cell.* 1980 Aug; 21(1): 303-13.
76. Li, H., Y. S. Haviv, C. A. Derdeyn, J. Lam, C. Coolidge, E. Hunter, D. T. Curiel, and J. L. Blackwell. Human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation is compatible with adenovirus replication and facilitates efficient dispersion of viral gene products and de novo-synthesized virus particles. *Hum-Gene-Ther.* 2001 Dec 10; 12(18): 2155-65.
77. Lisanti, M. P., M. Sargiacomo, L. Graeve, A. R. Saltiel, and E. Rodriguez-Boulan. Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1988 Dec; 85(24): 9557-61.
78. Logan, J., and T. Shenk. In vivo identification of sequence elements required for normal function of the adenovirus major late transcriptional control region. *Nucleic-Acids-Res.* 1986 Aug 11; 14(15): 6327-35.
79. Lorence, R. M., K. W. Reichard, B. B. Katubig, H. M. Reyes, A. Phuangsab, B. R. Mitchell, C. J. Cascino, R. J. Walter, and M. E. Peebles. Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy. *J-Natl-Cancer-Inst.* 1994 Aug 17; 86(16): 1228-33.
80. Lorence, R.M., Katubig, B.B., Reichard, K.W., Reyes, H.M., Phuangsab, A., Sassetti, M.D., Walter, R.J. & Peebles, M.E. Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus Therapy. 1994. *Cancer Res.* 54, 6017-6021.

81. Lu, H., M. D. Reach, E. Minaya, and C. S. Young. The initiator element of the adenovirus major late promoter has an important role in transcription initiation in vivo. *J-Virol.* 1997 Jan; 71(1): 102-9.
82. Lutz, P., and C. Kedinger. Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J-Virol.* 1996 Mar; 70(3): 1396-405.
83. Mabit, H., M. Y. Nakano, U. Prank, B. Saam, K. Dohner, B. Sodeik, and U. F. Greber. Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J-Virol.* 2002 Oct; 76(19): 9962-71.
84. Maisner, A., B. Mrkic, G. Herrler, M. Moll, M. A. Billeter, R. Cattaneo, and H. D. Klenk. Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J-Gen-Virol.* 2000 Feb; 81(Pt 2): 441-9.
85. Malvoisin, E., and T. F. Wild. Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J-Gen-Virol.* 1993 Nov; 74 ( Pt 11): 2365-72.
86. Mastromarino, P., C. Conti, P. Goldoni, B. Hauttecoeur, and N. Orsi. Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J-Gen-Virol.* 1987 Sep; 68 ( Pt 9): 2359-69.
87. Marsh, M., & Helenius, A. Virus entry into animal cells. 1990. *Adv. Virus Res.* 36, 107-151.
88. Melcher, A., S. Todryk, N. Hardwick, M. Ford, M. Jacobson, and R. G. Vile. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat-Med.* 1998 May; 4(5): 581-7.
89. Milstein, C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays.* 1999 Nov; 21(11): 966-73.
90. Modrow, S. & Falke, D. Adenoviren. In "Molekulare Virologie", pp. 391-411; Spektrum Akademischer Verlag.
91. Moll, Markus. Dissertation zur Erlangung des Dokortitels: Dr.rer.physiol im Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. H.-D.Klenk, 2003.
92. Moller, J. R., B. Rager-Zisman, P. C. Quan, A. Schattner, D. Panush, J. K. Rose, and B. R. Bloom. Natural killer cell recognition of target cells expressing different antigens of vesicular stomatitis virus. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1985 Apr; 82(8): 2456-9.
93. Moore, M., N. Horikoshi, and T. Shenk. Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A.* 1996 Oct 15; 93(21): 11295-301.
94. Morrison, T., C. McQuain, and L. McGinnes. Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: requirements for membrane fusion. *J-Virol.* 1991 Feb; 65(2): 813-22.

95. Morse, M. A., and H. K. Lyerly. Immunotherapy of cancer using dendritic cells. *Cytokines-Cell-Mol-Ther.* 1998 Mar; 4(1): 35-44.
96. Mulvihill, S., R. Warren, A. Venook, A. Adler, B. Randlev, C. Heise, and D. Kirn. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene-Ther.* 2001 Feb; 8(4): 308-15.
97. Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998 Dec 7; 188(11): 2033-45.
98. Nagai, Y. Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol.* 1993; 1, 81-7.
99. Nemunaitis, J., I. Ganly, F. Khuri, J. Arseneau, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, P. Maples, L. Romel, B. Randlev, T. Reid, S. Kaye, and D. Kirn. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer-Res.* 2000 Nov 15; 60(22): 6359-66.
100. Nemunaitis, J., F. Khuri, I. Ganly, J. Arseneau, M. Posner, E. Vokes, J. Kuhn, T. McCarty, S. Landers, A. Blackburn, L. Romel, B. Randlev, S. Kaye, and D. Kirn. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J-Clin-Oncol.* 2001 Jan 15; 19(2): 289-98.
101. Nemunaitis, J., C. Cunningham, A. Buchanan, A. Blackburn, G. Edelman, P. Maples, G. Netto, A. Tong, B. Randlev, S. Olson, and D. Kirn. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene-Ther.* 2001 May; 8(10): 746-59.
102. Nemunaitis, J., N. Senzer, C. Cunningham, and T. W. Dubensky. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Drug-Resist-Updat.* 2001 Oct; 4(5): 289-91.
103. Nicotera, P., M. Leist, and E. Ferrando-May. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol-Lett.* 1998 Dec 28; 102-103: 139-42.
104. Pilder, S., M. Moore, J. Logan, and T. Shenk. The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol-Cell-Biol.* 1986 Feb; 6(2): 470-6.
105. Pinol-Roma, S., and G. Dreyfuss. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature.* 1992 Feb 20; 355(6362): 730-2.
106. Poste, G. Virus-induced polykaryocytosis and the mechanism of cell fusion. *Adv-Virus-Res.* 1970; 16: 303-56.
107. Poste, G. Mixed-culture polykaryocytosis: a new form of cellular recognition behaviour. *Life-Sci-II.* 1970 Apr 22; 9(8): 459-63.

108.  
Reichard, K. W., Lorence, R. M., Cascino, C. J., Peeples, M.E., Walter, R.J., Fernando, M.B., Reyes, H.M., & Greager, J.A. Newcastle disease virus selectivity kills human tumor cells. 1992. *J. Surg. Res.* 52, 488-453.
109.  
Reach, M., L. E. Babiss, and C. S. Young. The upstream factor-binding site is not essential for activation of transcription from the adenovirus major late promoter. *J-Virol.* 1990 Dec; 64(12): 5851-60.
110.  
Reach, M., L. X. Xu, and C. S. Young. Transcription from the adenovirus major late promoter uses redundant activating elements. *EMBO-J.* 1991 Nov; 10(11): 3439-46.
111.  
Reichel, R., S. D. Neill, I. Kovesdi, M. C. Simon, P. Raychaudhuri, and J. R. Nevins. The adenovirus E4 gene, in addition to the E1A gene, is important for trans-activation of E2 transcription and for E2F activation. *J-Virol.* 1989 Sep; 63(9): 3643-50.
112.  
Richardson, C. D., A. Scheid, and P. W. Choppin. Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology.* 1980 Aug; 105(1): 205-22.
113.  
Richardson, C. D., and P. W. Choppin. Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. *Virology.* 1983 Dec; 131(2): 518-32.
114.  
Rowe, W. P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrot, R.H. & Ward, T. G.. Isolation of a Cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953; 84, 570-573.
115.  
Rodriguez, R., E. R. Schuur, H. Y. Lim, G. A. Henderson, J. W. Simons, and D. R. Henderson. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer-Res.* 1997 Jul 1; 57(13): 2559-63.
116.  
Rogers, B. E., J. T. Douglas, C. Ahlem, D. J. Buchsbaum, J. Frincke, and D. T. Curiel. Use of a novel cross-linking method to modify adenovirus tropism. *Gene-Ther.* 1997 Dec; 4(12): 1387-92.
117.  
Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29; 239(4839): 487-91.
118.  
Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 Dec 20; 230(4732): 1350-4.
119.  
Sandig, V., K. Brand, S. Herwig, J. Lukas, J. Bartek, and M. Strauss. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat-Med.* 1997 Mar; 3(3): 313-9.
120.  
Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May 25;94(3):441-8.

121.  
Saphire, A. C., T. Guan, E. C. Schirmer, G. R. Nemerow, and L. Gerace. Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J-Biol-Chem.* 2000 Feb 11; 275(6): 4298-304.
122.  
Sarnow, P., C. A. Sullivan, and A. J. Levine. A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology.* 1982 Jul 30; 120(2): 510-7.
123.  
Sarnow, P., Y. S. Ho, J. Williams, and A. J. Levine. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell.* 1982 Feb; 28(2): 387-94.
124.  
Sauthoff, H., S. Heitner, W. N. Rom, and J. G. Hay. Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. *Hum-Gene-Ther.* 2000 Feb 10; 11(3): 379-88.
125.  
Schattner, A., Rager\_Zisman, B., & Bloom, B. R. Persistent viral infection affects tumorigenicity of a neuroblastoma cell line. 1985. *Cell Immunol.*; 90, 103-114.
126.  
Shenk, T., and J. Williams. Genetic analysis of adenoviruses. *Curr-Top-Microbiol-Immunol.* 1984; 111: 1-39.
127.  
Shenk. T. Adenoviridae: The viruses and their replication. In "Virology", 3 Ed. pp. 2111-2148. Edited by B.N. Fields, D.M. Knipe & P. M.Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
128.  
Sinkovics, J., and J. Horvath. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirol.* 1993; 36(4): 193-214.
129.  
Spielhofer, P., T. Bachi, T. Fehr, G. Christiansen, R. Cattaneo, K. Kaelin, M. A. Billeter, and H. Y. Naim. Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J-Virol.* 1998 Mar; 72(3): 2150-9.
130.  
Tamura, Y., P. Peng, K. Liu, M. Daou, and P. K. Srivastava. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science.* 1997 Oct 3; 278(5335): 117-20.
131.  
Thomas, G. P., and M. B. Mathews. DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell.* 1980 Nov; 22(2 Pt 2): 523-33.
132.  
Tollefson, A. E., A. Scaria, T. W. Hermiston, J. S. Ryerse, L. J. Wold, and W. S. Wold. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J-Virol.* 1996 Apr; 70(4): 2296-306.
133.  
Tollefson, A. E., J. S. Ryerse, A. Scaria, T. W. Hermiston, and W. S. Wold. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology.* 1996 Jun 1; 220(1): 152-62.

134.  
Ward, C. D., R. G. Paterson, and R. A. Lamb. Mutants of the paramyxovirus SV5 fusion protein: regulated and extensive syncytium formation. *Virology*. 1995 May 10; 209(1): 242-9.
135.  
White, J. M. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu-Rev-Physiol*. 1990; 52: 675-97.
136.  
White, J. M. Membrane fusion. *Science*. 1992 Nov 6; 258(5084): 917-24.
137.  
Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresch, and G. R. Nemerow. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993 Apr 23; 73(2): 309-19.
138.  
Wild, T. F., E. Malvoisin, and R. Buckland. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J-Gen-Virol*. 1991 Feb; 72 ( Pt 2): 439-42.
139.  
Wild, T. F., J. Fayolle, P. Beauverger, and R. Buckland. Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J-Virol*. 1994 Nov; 68(11): 7546-8.
140.  
Wold, W. S., and L. R. Gooding. Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology*. 1991 Sep; 184(1): 1-8.
141.  
Wold, W. S., A. E. Tollefson, and T. W. Hermiston. E3 transcription unit of adenovirus. *Curr-Top-Microbiol-Immunol*. 1995; 199 ( Pt 1): 237-74.
142.  
Yohn, D. S., W. M. Hammon, R. W. Atchison, and B. C. Casto. Oncolytic potentials of nonhuman viruses for human cancer. II. Effects of five viruses on heterotransplantable human tumors. *J-Natl-Cancer-Inst*. 1968 Aug; 41(2): 523-9.
143.  
Younghusband, H. B., and K. Maundrell. Adenovirus DNA is associated with the nuclear matrix of infected cells. *J-Virol*. 1982 Aug; 43(2): 705-13.
144.  
Younghusband, H. B. An association between replicating adenovirus DNA and the nuclear matrix of infected HeLa cells. *Can-J-Biochem-Cell-Biol*. 1985 Jun; 63(6): 654-60.
145.  
Yu, D. C., G. T. Sakamoto, and D. R. Henderson. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer-Res*. 1999 Apr 1; 59(7): 1498-504.
146.  
Yu, D. C., Y. Chen, M. Seng, J. Dilley, and D. R. Henderson. The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer-Res*. 1999 Sep 1; 59(17): 4200-3.
147.  
Zhou, H., W. O'Neal, N. Morral, and A. L. Beaudet. Development of a complementing cell line and a system for construction of adenovirus vectors with E1 and E2a deleted. *J-Virol*. 1996 Oct; 70(10): 7030-8.
148.  
Zielinski, T., and E. Jordan. Pozne wyniki obserwacji klinicznych nad działaniem onkolitycznym adenowirusow w raku szyjki macicy. *Nowotwory*. 1969 Jul-Sep; 19(3): 217-21.



## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk dafür, dass er meine Arbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg ermöglicht und großzügig unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich Herrn PD Dr. med. Matthias Dobbeltstein, meinem Doktorvater und Mentor, für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner zweijährigen Doktorarbeit danken. Seine kompetente Anleitung in Theorie und Praxis hat grundlegend zum Erfolg dieser Doktorarbeit beigetragen. In zahlreichen Diskussionen war er ein wichtiger Gesprächspartner und stets offen für Anregungen. Als liebenswürdiger Mentor hat sich Herr Dr. Dobbeltstein während meines Aufenthalts in Deutschland stets um meine Person und akademische Entwicklung gekümmert.

Im Rahmen meiner dreimonatigen PJ-Zeit auf der Station 123 der Abteilung Gastroenterologie des Klinikums der Philipps-Universität vor zwei Jahren waren Herr Prof. Dr.med Gerd Richter und Frau Dr.med Isabel Restrepo-Schäfer diejenigen, die mich über die akademische Bedeutung einer Promotion an einer deutschen Universität aufgeklärt haben. Beiden Personen gilt mein herzlicher Dank.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dobbeltstein danke ich herzlich für die stets erwiesene Hilfsbereitschaft. Die gute Kameradschaft motivierte stets aufs Neue, die Tücken des Laboralltags zu meistern. Insbesondere danke ich Laborassistentin Frau Claudia Lenz-Bauer, die mich mit Engagement und Hingabe in die Kunst der Labormethodik eingeführt hat.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. rer.nat Andrea Maisner und Herrn Dr. rer.nat Markus Moll für die ständige Hilfsbereitschaft und die anregenden Vorschläge zur Entwicklung dieses Projektes. Als Masernvirus-Forscher haben beide Kollegen interessante und wissenschaftlich wertvolle Beiträge geleistet.

Aus dem Institut für Humangenetik des Klinikums der Philipps-Universität haben Frau PD Dr. rer.nat Barbara Fritz und ihre Laborassistentin Frau Evelyn Horn eine wertvolle Kollaboration geleistet. Mit Ihrer Hilfestellung habe ich die Technik der FISH-Analyse erlernt und sie an die Bedingungen einer adenoviralen fusogenen Infektion technisch angepasst, damit diese Prozedur mit Erfolg durchgeführt werden konnte.

Des weiteren haben die folgenden Personen diese Doktorarbeit unterstützt:

- Herr Prof. Dr. Roberto Cattaneo und sein Laborassistent Sompong Vongpunsawad stellten das pCG F&H-Expressionsplasmid zur Verfügung.
- Herr Prof. Dr. Gemsa und Mitarbeiter erlaubten die Benutzung des Luminometers im Institut für Immunologie.
- Meine Promotionskollegen Herr Dipl. Biol. Christoph Dohmesen und Herr. Dipl. Biol. Michael Schümann gaben mir stets wertvolle Anregungen und Ratschläge für die Anfertigung meiner Dissertation.
- Meine Freundin, cand. med. Caroline Dorn, trug mit großzügiger Hilfsbereitschaft zur Korrektur dieser Arbeit bei.
- Die FAZIT-Stiftung der Frankfurter Allgemeine Zeitung unterstütze mich mit einem zweijährigen Stipendium.

Zuletzt gilt mein persönlicher Dank meinen Freunden in Marburg, Buenos Aires und Concepción del Uruguay (Provinz Entre Ríos- Argentinien), insbesondere meinen Eltern und Geschwistern.

Das Ende dieser Promotion öffnete neue Wege für meine klinische und wissenschaftliche Weiterbildung. Diese neue Etappe wird im Klinikum der Philipps-Universität Marburg stattfinden. Ich danke Herrn Prof. Dr. med Rudolf Arnold und Frau PD Dr. med Judith Roth-Dobbelstein für die ständige Hilfe und Unterstützung bei dem Beginn dieses neuen Lebensabschnitts.

Der Hervorragende Beistand der Oberärzte PD Dr.med Dieter Hörsch und Prof. Dr.med Gerd Richter, sowie die äußerst freundliche Stimmung des Pflegepersonals der Station 123 ermöglichen die beste Einführung in meine klinische Weiterbildung.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name:	Horn
Vorname:	Germán Pedro
Wohnort:	Marburg an der Lahn
Adresse:	Ketzerbach 54; 35037 Marburg
Staatsangehörigkeit:	argentinisch
Geburtsdatum:	21.08.1975
Geburtsort:	Concepción del Uruguay Provinz Entre Rios, Argentinien
Eltern:	Leonel Horn und Enriqueta Morera
Geschwister:	Pablo Enrique (26), Patricia Raquel (43), Beatriz Silvana (41)
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch-lutherisch

## Schulischer Werdegang

1982-1988	Normal Mariano Moreno Schule in Concepción del Uruguay (Grundschule)
1989-1991	Republica de Italia Schule (Bilinguales Gymnasium Spanisch-Italienisch)
1992-1993	Normal Mariano Moreno Schule (Gymnasium)
1993	Abschluss: Hochschulreife mit biologischer Ausrichtung Notendurchschnitt: 9,67 (*)

### **(\*) Anmerkung:**

**Die argentinische Notenskalierung zur Bewertung der Studienleistungen besteht aus 10 Punkten.**

**Die besten akademischen Prüfungsleistungen werden mit „10“ und die schlechtesten mit „1“ bewertet.**

## Universitäre Laufbahn

1994	Propädeutische Ausbildung an der Universität Buenos Aires Abschlussnote: 8,17
1995	Beginn des Hauptstudiums der Medizin an der Universität Buenos Aires
1995-1997	Ausbildung in den grundlegenden Fächern der Medizin Aufnahme in den „Elite-Studienplan B“ -besondere akademische Auszeichnung-
1997-2001	Aufnahme in den Akademischen Pilotplan für klinische und chirurgische Ausbildung des Anchorena Sanatoriums -besondere akademische Auszeichnung-
2001	Abschluss: Arzt mit Ehrendiplom -Universitätspreis- Abschlussnote: 9,25

## **Universitäre Lehrtätigkeit**

1997	Ausbildung zum Assistenten im Fach Mikrobiologie, Abteilung des Fachbereichs Humanmedizin der Universität Buenos Aires
	Abschluss: Stellvertretender Assistent in Allgemeiner Mikrobiologie mit Virologischer Ausrichtung
1997-1999	Assistent in der virologischen Ausbildung von Medizinstudenten
1997-1998	Assistent im Fach Allgemeine Mikrobiologie im Rahmen der Ausbildung für Hebammen
1998-1999	Assistent im Spezialkurs Mikrobiologie für Medizinstudenten bei Prof.Dr. Norberto Sanjuan
1998-1999	Assistent im Fach Allgemeine Mikrobiologie im Rahmen der Ausbildung für Krankenpfleger
1999	Besondere Auszeichnung als Assistent im Dozentenwettbewerb
1999	Ausbildung zum Assistenten im Fach Pharmakologie, Abteilung des Fachbereichs Humanmedizin der Universität Buenos Aires

## **Grundlagenwissenschaftliche Ausbildung**

1996-1997	Laborassistent in dem „Labor für Experimentelle Pathologie, Virologie und Elektronenmikroskopie“ von Prof.Dr. Norberto Sanjuan
2000	Stipendiat des „Argentinischen Labors für Forschung und Elektronenmikroskopie“ Abschluss: Elektronenmikroskop-Operator
von August 2001 bis August 2003	Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med Matthias Dobbstein. Institut für Virologie der Philipps-Universität

## **Praktische Ausbildung in den klinischen und chirurgischen Fächern**

1999-2000	Tägliche Anwesenheit im Sanatorium Anchorena als PJ-Student 12 Stunden pro Tag Innere Medizin, Allgemeine und Spezielle Chirurgie
1998-1999	24-stündiger Dienst im Notfallbereich des Anchorena Sanatoriums, (einmal in der Woche) Innere Medizin
2000	24-stündiger Dienst im Notfallbereich des Anchorena Sanatoriums, (zweimal in der Woche) Innere Medizin und Allgemeine Chirurgie
<b>November 2000- Januar 2001</b>	<b>PJ-Zeit auf Station 123 des Klinikums der Philipps-Universität Leiter: Prof. Dr. med Gerd Richter</b>

## **Sprachkenntnisse**

Spanisch	-Muttersprache
Deutsch	-Deutsch-Argentinisches Kulturinstitut Buenos Aires: Grundstufe Mittelstufe -Internationales Zentrum für Sprache und Kultur Philipps-Universität Marburg: Oberstufe <b>Deutsche Sprachprüfung für den Hochschulzugang für Studentenbewerber (DSH) bestanden</b> <b>Fließende Beherrschung der deutschen Sprache in Wort und Schrift</b>
Italienisch	Gymnasialzeit in einer bilingualen spanisch-italienischen Schule -Scuola Italiana Republica d'Italia-  Weiterbildung in dem Institut Dante Alighieri Oberstufe
Englisch	-Sprachabteilung der Universität Buenos Aires: Grundstufe Ausbildung für medizinisches und wissenschaftliches Englisch

## **Preise und Auszeichnungen**

1989	„Bester Gymnasialstudent“
1990	„Bester Gymnasialstudent“
1991	„Bester Gymnasialstudent“
1993	„Bester gymnasialer Notendurchschnitt“
1993	„Bester Abiturient in biologischer Fachrichtung“ -Auszeichnung verliehen durch den Provinzsenat von Entre Rios-
2001	„Ehrendiplom“ des Fachbereichs Humanmedizin der Universität Buenos Aires

## **Ausübung des Arztberufes**

März bis Juni 2001	Assistenzarztstelle in der Abteilung Innere Medizin des Sanatoriums Anchorena, Buenos Aires, Argentinien
Ab 1.September 2003	Assistenzarztstelle in der Abteilung Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Stoffwechsel und Endokrinologie der Philipps-Universität, Leiter: Prof. Dr. med R. Arnold, Marburg an der Lahn

**Promotion**

von August 2001  
bis Juli 2003

Grundlagenwissenschaftliche und experimentelle Doktorarbeit  
Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg  
Doktorvater: PD Dr. med Matthias Döbelstein.  
Thema: „Verbesserung der Effizienz onkolytischer Adenoviren in der  
Krebstherapie“  
Finanzierung:  
Stipendiat der Fazit Stiftung der Frankfurter Allgemeinen Zeitung

Aktive Teilnahme an  
wissenschaftlichen  
Veranstaltungen

- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie  
Posterpräsentation -Erlangen, April 2002-
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie  
Posterpräsentation (in Ko-Autorschaft) -Berlin, April 2003-
- Fourth Workshop on Intracellular Transport and Maturation of Proteins  
Posterpräsentation -Marburg, April 2002-
- Virologisches Seminar des Instituts für Virologie  
Vortrag -Marburg, Juni 2002-
- Congress of the International Union of Microbiological Societies  
Posterpräsentation -Paris, Juli 2002-
- 58° Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und  
Stoffwechsel-Krankheiten (DHVS)  
Posterpräsentation -Nürnberg, September 2003-

Germán Horn

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel :

„*Virusinduzierte Fusion zur Beseitigung von Tumorzellen*“

im Institut für Virologie des medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.med H.-D.Klenk mit Unterstützung durch PD Dr.med Matthias Dobbelstein ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in den folgenden wissenschaftlichen Veranstaltungen und Publikationsorganen präsentiert bzw. veröffentlicht:

### *Wissenschaftliche Veranstaltungen:*

**1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie,**

Posterpräsentation; Erlangen, April 2002:

„*The spread and yield of a hybrid adenovirus is enhanced by measles virus glycoprotein-induced fusion*“

German Horn, Sompong Vongpunsawad, Roberto Cattaneo, Markus Moll, Andrea Maisner and Matthias Dobbelstein

**2. Congress of the International Union of Microbiological Societies (IUMS),**

Posterpräsentation; Paris, Juli 2002:

„*The spread and yield of a hybrid adenovirus is enhanced by measles virus glycoprotein-induced fusion*“

German Horn, Sompong Vongpunsawad, Roberto Cattaneo, Markus Moll, Andrea Maisner and Matthias Dobbelstein

**3. Fourth Workshop on Intracellular Transport and Maturation of Proteins,**

Posterpräsentation; Marburg, April 2002:

„*The spread and yield of a hybrid adenovirus is enhanced by measles virus glycoprotein-induced fusion*“

German Horn, Sompong Vongpunsawad, Roberto Cattaneo, Markus Moll, Andrea Maisner and Matthias Dobbelstein

**4. Virologisches Seminar des Instituts für Virologie der Philipps-Universität,**

Vortrag; Marburg, Juni 2002:

„*Fusionsfähige Adenoviren: Verbesserung der onkolytischen Effizienz*“

German Horn

5. **58° Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechsel-Krankheiten (DHVS)**, Posterpräsentation; Nürnberg, September 2003:

„*Onkolytische Effizienz eines Adenovirus wird durch Zellfusion verbessert*“

German Horn, Roberto Cattaneo und Matthias Döbelstein

6. **Fortbildungskolloquium der Abteilung Innere Medizin des Klinikums der Philipps-Universität**, Vortrag; Marburg, November 2003:

„*Virusinduzierte Fusion zur Beseitigung von Tumorzellen*“

German Horn

*Veröffentlichung dieser Dissertation:*

JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 2005, p. 1911–1917 Vol. 79, No. 3  
0022-538X/05/\$08.00\_0 doi:10.1128/JVI.79.3.1911–1917.2005  
Copyright © 2005, American Society for Microbiology.

## Enhanced Cytotoxicity without Internuclear Spread of Adenovirus upon Cell Fusion by Measles Virus Glycoproteins

German P. Horn,<sup>1,2</sup> Sompong Vongpunsawad,<sup>3</sup> Evelyn Kornmann,<sup>4</sup> Barbara Fritz,<sup>4</sup>

Dirk P. Dittmer,<sup>5</sup> Roberto Cattaneo,<sup>3</sup> and Matthias Döbelstein<sup>1,6\*</sup>

*Institut für Virologie,<sup>1</sup> Abteilung Gastroenterologie, Stoffwechsel und Endokrinologie,<sup>2</sup> and Zentrum für Humangenetik,<sup>4</sup>*

*Klinikum der Philipps, Universität Marburg, Marburg, Germany; Molecular Medicine Program, Mayo Clinic, and Virology and Gene Therapy, Mayo Graduate School, Rochester, Minnesota<sup>3</sup>; Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina<sup>5</sup>; and Medical Biotechnology Center, University of Southern Denmark, Odense, Denmark<sup>6</sup>*

Received 5 July 2004/Accepted 10 September 2004

---

German Pedro Horn



## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

a) in Marburg:

Arnold, Barth, Bauer, Baum, Becker, Beyer, Berndt, Bien, Daut, Dobbelstein, Doss, Ebel, Eilers, Folz, Garten, Gamsa, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Grundmann, Grezeschik, Gudermann, Happel, Hasilik, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Herzum, Hesse, Höffken, Hörsch, Hofbauer, Hofmann, Jerrentrup, Kann, Kern, Kim-Berger, Klaus, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Lang, Lange, Lill, Maisner, Maisch, Martin, Mennel, Moll, Moosdorf, Neubauer, Oertel, Radsak, Renz, Restrepo, Richter, Riera, Roth-Dobbelstein, Romminger, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schreiber, Schwarz, Slenczka, Sturm, Suske, Tebbe, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, v. Wichert

b) in Buenos Aires:

Alvarez, Argento, Bagg, Battani, Blejman, Cardinali, Carrizo, Casallerrey, Castaño, Chipont, Cruciani, Czerniuk, de la Riva, de Quiros, Di Fonso, Eleta, Fernandez Pardal, Fustinoni, Gerbi, Ghirlanda, Gonzalez Cappa, Gutierrez, Iermoli, Iraldi, Lazcano, Lipszyc, Lopez, Lucentini, Marini, Martinez Peralta, Marufo, Mazzafero, Mele, Melero, Michelli, Murno, Mutschnik, Needleman, Oliva, Padilla, Parisi, Pascutto, Patito, Pecci Saavedra, Provenzano, Rabec, Reyes Toso, Romi, Sanjuan, Sordelli, Spikermann, Trombeta, Ubino, Ubiña, Valdes, Vega, Velan, Yacomotti, Zimmermann